



Departamento de Engenharia Química e Biológica

Desenvolvimento de um sistema de quantificação de TCA em solução aquosa por voltametria

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Processos Químicos e Biológicos

Autora

Ana Patrícia Almeida Freitas

Orientadores

Professor Doutor Luís Miguel Moura Neves de Castro

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Professora Doutora Ana Cristina Araújo Veloso

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Professor Doutor António Manuel Coelho Lino Peres

Escola Superior Agrária de Bragança

Professor Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

Escola Superior Agrária de Bragança

Instituto Politécnico de Coimbra

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Coimbra, dezembro, 2013

*“Descobrir consiste em olhar para o que todos veem
e pensar uma coisa diferente”*

Roger Von Oech

AGRADECIMENTOS

Quero dedicar este espaço a todas as pessoas que contribuíram para a realização desta dissertação, às quais manifesto os meus maiores e mais sinceros agradecimentos.

Quero agradecer em primeiro lugar aos meus orientadores, Doutora Ana Veloso, Doutor Luís Miguel Castro, Doutor António Peres e Doutor Luís Dias, por toda a dedicação, apoio, sugestões e críticas ao longo de todo este trabalho.

Quero agradecer aos meus amigos e colegas, pelos conselhos, companhia e momentos de boa disposição. Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química e Biológica, muito obrigada.

Ao Pedro, agradeço por estar sempre do meu lado, por todos os incentivos e todo o amor e paciência que tem demonstrado, principalmente, nos momentos difíceis.

Aos meus pais, que me proporcionaram o acesso ao ensino superior e que sem o seu apoio não teria sido possível, ao meu irmão e à restante família, quero agradecer todo o incitamento, compreensão, paciência, apoio e carinho que me deram e têm dado em toda a minha vida.

A todos agradeço do fundo do coração!

RESUMO

A garantia da qualidade de produtos alimentares constitui um requisito fundamental no setor alimentar pelo que, na última década se tem assistido à intensificação do desenvolvimento e otimização de processos de controlo. O setor vinícola, em particular, tem essa permanente preocupação em relação à presença de contaminantes que possam conferir ao vinho outras características organoléticas consideradas como defeitos, nomeadamente, o 2,4,6-tricloroanisol (TCA).

A presença de TCA no vinho, atribuída à migração a partir de rolhas de cortiça contaminadas com TCA, tem sido apontada como responsável pela ocorrência do referido defeito organolético do vinho, conhecido como “cheiro/gosto a mofo” ou “gosto a rolha”, o qual tem levado a perdas económicas bastante elevadas no setor vinícola mundial. O limite humano para a sua deteção sensorial é inferior a 5 ng/L, pelo que uma concentração reduzida de TCA no vinho é facilmente detetada pelo consumidor.

Por este motivo, é de grande relevância para a indústria corticeira, nomeadamente para a indústria de produção de rolhas de cortiça para o engarrafamento de vinho, conseguir identificar a presença deste composto na rolha antes da sua utilização ou ainda nas pranchas de cortiça usadas na produção de rolhas, de modo a poderem ser implementadas medidas corretivas que permitam eliminar ou reduzir o teor de TCA nas mesmas, evitando assim a contaminação futura do vinho engarrafado.

Diversas técnicas são utilizadas para detetar a presença do TCA no vinho ou em rolhas, sendo de especial relevância as baseadas em cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa. Contudo, estas técnicas analíticas capazes de detetar e quantificar níveis de TCA da ordem dos ng/L, são em geral dispendiosas, requerendo equipamentos analíticos caros e pessoal técnico altamente qualificado, não sendo portáteis e por isso dificilmente aplicáveis *in-situ*, necessitando de um pré-tratamento das amostras complexo com a finalidade de extrair o TCA e concentrá-lo para posterior quantificação. Assim, este procedimento de deteção de TCA, tido como método de referência, não é uma solução economicamente viável para grande parte das pequenas e médias empresas corticeiras, sendo apenas aplicável a um reduzido número de amostras, o que limita a real deteção de contaminações de TCA na cortiça e nas rolhas fabricadas.

Neste trabalho, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica para detetar TCA na água de cozedura de pranchas de cortiça utilizadas para a produção de rolhas para engarrafamento de vinho. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, em menos de 15 minutos, com reduzido uso de solventes orgânicos e sem qualquer pré-tratamento da amostra. A técnica proposta apresenta limites de deteção de $0,31 \pm 0,01$ ng/L e de quantificação de $0,95 \pm 0,05$ ng/L inferiores ao limiar de deteção humano. Ensaio realizados em soluções não contaminadas com TCA permitiram quantificar uma concentração de TCA da ordem do referido limite de quantificação ($1,0 \pm 0,2$ ng/L), o que confirma o desempenho satisfatório da metodologia proposta. Por outro lado, o método apresentou uma repetibilidade satisfatória (valores inferiores a 3%) quando aplicado a amostras reais de água de cozedura das pranchas de cortiça obtidas no processo industrial de produção de rolhas. Verificou-se ainda que os teores de TCA nas amostras aquosas determinados pela técnica proposta são concordantes com os obtidos por GC-MS (coeficiente de correlação igual a 0,98), o que confirma a precisão satisfatória da metodologia proposta. Assim, uma vez que esta nova abordagem é um método rápido, de baixo custo, portátil e de fácil utilização, pode ser visto como uma ferramenta alternativa e útil para aplicações industriais in-situ, permitindo a deteção de TCA numa fase inicial da produção de rolhas de cortiça. Esta técnica pode contribuir para a implementação mais eficaz de procedimentos de segregação da cortiça contaminada com o intuito de reduzir ou evitar futuras contaminações de vinho engarrafado com TCA.

Com base no presente trabalho foram publicados os seguintes dois artigos:

Peres, A. M., Freitas, P., Dias, L. G., Sousa, M. E. B. C., Castro, L. M., Veloso, A. C. A. (2013) “*Cyclic voltammetry: A tool to quantify 2,4,6-trichloroanisole in aqueous samples from cork planks boiling industrial process*”. *Talanta*, 117, pp. 438-444.

Freitas, P., Dias, L. G., Peres, A. M.; Castro, L. M. Veloso, A. C. A. (2012). “*Determination of 2,4,6-trichloroanisole by cyclic voltammetry*”. *Procedia Engineering*. Volume 47, 1125-1128.

PALAVRAS-CHAVE

2,4,6-tricloroanisol; Voltametria cíclica; Cortiça; Aplicações industriais *in-situ*; Método de adição padrão.

ABSTRACT

The quality control of food products is a fundamental requirement on the food sector. In the last decade an intensification of the development and optimization of the control processes have been reported. In particular, for the wine sector, the presence of certain contaminants, namely, 2,4,6-trichloroanisole (TCA) has been a permanent concern, since they may contribute to the appearance of undesirable organoleptic characteristics in wine, considered as defects.

The presence of TCA in wine, due to the migration from the cork stoppers contaminated with TCA, has been pointed as the main responsible for the wine organoleptic defect, known as “cork taint”. That phenomenon has driven to economic losses all over the world in wine sector. The human’s TCA detection threshold is lower than 5 ng/L and therefore consumers easily detect its presence in wine in very low concentrations.

For that reason, it is extremely important for the cork industry, mainly for cork stoppers industry, to identify the presence of this compound in the cork stoppers before their use or even before the production of cork stoppers. This last possibility, would allow implementing corrective measures to eliminate or reduce the concentration of TCA on cork stoppers, avoiding the future contamination of bottled wine.

Several techniques have been used for the detection of TCA in wine or in cork stoppers. Techniques based on gas chromatography with mass spectrometry detection are the most relevant. However, these analytical techniques, capable of detect and quantify the TCA at ng/L levels, are usually expensive, require the use of expensive analytical equipment, skilled technicians qualified and requires a complex sample pre-treatment to extract and concentrate TCA before its quantification. In addition, since this equipment is not portable, the *in-situ* analysis is more difficult. So, this TCA’s detection method used as a reference method is not an economically viable solution for the small and medium cork industries. That is a reason for the reduced number of samples analyzed, which restrict the real detection of TCA contaminations in cork planks or in cork stoppers.

In this work, cyclic voltammetry was applied to detect TCA in water samples collected during the manufacture of cork stoppers for bottled wine. The method enables

samples analysis in less than 15 minutes at ambient temperature, with reduced use of organic solvents and without any pre-treatment of the samples. The results obtained showed that this proposed technique has detection and quantification limits of 0.31 ± 0.01 ng/L and 0.95 ± 0.05 ng/L respectively, which are lower than the human threshold detection level. Assays with blank solutions (without the presence of TCA) allowed to estimate a TCA's concentration in the order of the referenced quantification limit (1.0 ± 0.2 ng/L), confirming the satisfactory performance of the proposed methodology. For the aqueous samples from the industrial cork planks boiling procedure, intra-day repeatability assays were below 3%. Furthermore, TCA content in the aqueous samples determined by this new approach were in agreement with those obtained by GC-MS (correlation coefficient equals to 0.98), confirming the satisfactory accuracy of this proposed methodology. Therefore, as this new approach is a fast, low-cost, portable and an easy method to use, it can be an alternative and helpful tool to *in-situ* industrial applications, allowing the detection of releasable TCA in an initial phase of cork stoppers production. This method could also allow the implementation of more effective cork procedures to segregate contaminated cork in order to reduce or avoid future TCA contaminations of the bottled wine.

Based on this work it was published the following two articles:

Peres, A. M., Freitas, P., Dias, L. G., Sousa, M. E. B. C., Castro, L. M., Veloso, A. C. A. (2013) “*Cyclic voltammetry: A tool to quantify 2,4,6-trichloroanisole in aqueous samples from cork planks boiling industrial process*”. *Talanta*, 117, pp. 438-444.

Freitas, P., Dias, L. G., Peres, A. M.; Castro, L. M. Veloso, A. C. A. (2012). “*Determination of 2,4,6-trichloroanisole by cyclic voltammetry*”. *Procedia Engineering*. Volume 47, 1125-1128.

KEY-WORDS

2,4,6-trichloroanisole; Cyclic Voltammetry; Cork; *In-situ* industrial applications; Standard addition method.

ÍNDICE

1. Introdução Geral	3
1.1. Enquadramento e Motivação.....	3
1.2. Objetivo.....	4
1.3. Organização da tese.....	4
2. A cortiça: contaminação com 2,4,6-Tricloroanisol.....	9
2.1. Cortiça	9
2.1.1. A produção de rolhas de cortiça.....	10
2.1.2. O problema do “gosto a rolha”	13
2.2. Formação do TCA.....	13
2.3. Controlo de qualidade na cortiça.....	15
2.3.1. Metodologia analítica para determinação do TCA	15
2.3.2. Voltametria	21
3. Material e Métodos	29
3.1. Escolha do equipamento e solventes.....	29
3.2. Reagentes	31
3.3. Amostras.....	31
3.4. Metodologias de Quantificação do 2,4,6-tricloroanisol	32
3.4.1. Análise por GC-MS	32
3.4.2. Análise por voltametria cíclica	33
4. Resultados e Discussão	43
4.1. Experiências Preliminares	43
4.2. Validação do método de quantificação do 2,4,6-tricloroanisol.....	47
4.2.1. Estudo da repetibilidade do sinal do solvente.....	47

4.2.2. Identificação dos picos de oxidação e de redução do TCA	48
4.2.3. Método de Calibração, limites de detecção e quantificação	50
4.3. Precisão e exatidão da análise por voltametria cíclica	51
5. Conclusões	57
Referências Bibliográficas	I

ÍNDICE FIGURAS

Figura 2.1 Montado e descortiçamento.....	11
Figura 2.2 Cozedura da cortiça	12
Figura 2.3 Esquema do processo de transformação da casca do sobreiro (cortiça) em rolha	12
Figura 2.4 Estrutura química do 2,4,6-tricloroanisol (TCA)	14
Figura 2.5 Representação das estruturas químicas do TCP e TCA	15
Figura 2.6 Esquema simplificado do circuito de potencial controlado usado em voltametria com três elétrodo.....	21
Figura 2.7 Esquema do potencial de onda triangular da voltametria cíclica	23
Figura 2.8 Voltamograma cíclico representativo dos picos de corrente e potencial do ferrocianeto	24
Figura 2.9 Voltamograma cíclico para um processo redox irreversível (curva A) e quase-reversível (curva B)	25
Figura 3.1 Elétrodo de trabalho (a), auxiliar (b) e de referência (c) e dispositivo de medição (d) utilizados nas experiências.	34
Figura 3.2 Representação gráfica da expressão da calibração por adição de padrão com multipadrões.....	36
Figura 3.3 Áreas dos picos de redução e de oxidação dos voltamogramas cíclicos, usadas para calcular sinal global de TCA na solução de ACN/água com 0,1 M de TBAP.	38
Figura 4.1 Voltamogramas obtidos nos ensaios realizados na otimização das proporções volumétricas de ACN/água, com TCA (10 mg/L) e TBAP (0,1 M).....	44
Figura 4.2 Voltamogramas obtidos para amostras com diferente concentração de TCA, com 0,1 M de TBAP e proporção ACN/água (1,5:1; v:v).	45
Figura 4.3 Voltamogramas obtidos no estudo do efeito do TBAP na análise de TCA em mistura de ACN/água (1,5:1; v:v).....	46

Figura 4.4: Voltamogramas de soluções com diferentes concentrações de TCA, com ACN/água (1,5:1; v:v) e TBAP (0,1 M).	47
Figura 4.5 Voltamogramas cíclicos do ensaio de repetibilidade das soluções de ACN/água (1,5:1, v:v) com 0,1 M de TBAP.	48
Figura 4.6 Voltamogramas de misturas ACN/água (1,5:1; v:v), com 0,1 M de TBAP, sem (0 ng/L) e com TCA (1 e 4 ng/L).	49
Figura 4.7 Voltamogramas de soluções com diferentes concentrações de TCA em ACN/água (1,5:1; v:v) com TBAP (0,1 M).	50
Figura 4.8 Curva de calibração obtida pelo método de adição de multipadrões usada para calcular os limites teóricos de detecção e de quantificação de TCA através da voltametria cíclica.	51
Figura 4.9 Voltamogramas cíclicos de três soluções de amostras de água de cozedura (ACN/amostra (1,5:1; v:v) TBAP (0,1 M)) com diferentes concentrações de TCA de acordo com os dados obtidos por GC-MS.	52
Figura 4.10 Curva de calibração obtida para o cálculo da concentração de TCA em amostras de água de cozedura de pranchas de cortiça através de voltametria cíclica.	53
Figura 4.11 Concentrações de TCA nas amostras reais de água de cozedura das pranchas de cortiça, estimadas por voltametria cíclica comparativamente às obtidas por GC-MS, método considerado como referência.	54

ÍNDICE TABELAS

Tabela 2.1 Resumo das principais técnicas e limites de detecção descritos na literatura. ..	19
Tabela 4.1 Parâmetros do modelo de regressão linear e respectivos intervalos de confiança com níveis de significância de 5%.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Ampere

ACN – Acetonitrilo

CE – Contra-elétrodo

CPOMT – Clorofenol *O*-metiltransferase

DLLME – Microextração dispersiva líquido-líquido

DSPE – Extração dispersiva em fase sólida

E – Potencial (V)

ECD – Detecção por captura de eletrões

ER – Elétrodo de referência

ET – Elétrodo de trabalho

GC – Cromatografia gasosa

HS – *Headspace*

I – Intensidade de corrente elétrica (A)

IL-SDME – Microextração de gota única por líquido iónico

IMS – Espectrometria de mobilidade iónica

L – Litro

M – Molaridade (M = mol/L)

MAE – Extração assistida por micro-ondas

MCC – Separação em coluna multicapilar

mg – Miligrama

min – Minuto

MS – Espectrometria de massa

MSTFA – N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamido

ng – Nanograma

PCA – 2,3,4,5,6-Pentacloroanisol

ppm – Partes por milhão (ppm = mg/L)

ppt – Partes por trilião (ppt = ng/L)

rpm – Rotação por minuto

s – Segundo

SBSE – Extração por adsorção com recurso a barra de agitação

SDME – Microextração de gota única

SIDA – Diluição de isótopo estável

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

TBA – 2,4,6-Tribromoanisol

TBAP – Perclorato de tetrabutilamónio

TCA – 2,4,6-Tricloroanisol

TCP – 2,4,6-Triclorofenol

TeCA – 2,3,4,6-Tetracloroanisol

US – Ultrasons

V – Volt

v:v – Volume por volume

VC – Voltametria cíclica

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

Neste capítulo pretende-se enquadrar o tema do trabalho de dissertação realizado, realçando o que o motivou e o objetivo pelo qual se regeu. Ainda neste capítulo será feita uma abordagem geral à estrutura e organização deste documento.

1.1. ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO

O estudo efetuado centra-se essencialmente na determinação de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) na água de cozedura de pranchas de cortiça, proveniente de uma unidade industrial de produção de rolhas de cortiça. O motivo que se encontra na génese deste estudo prende-se com a necessidade de detetar a presença deste composto e quantificá-lo numa fase inicial do processo de fabrico de rolhas de cortiça, de modo a garantir que estas não se encontram contaminadas com este composto ou, em caso de contaminação, permitir a implementação de medidas de controlo e redução dos níveis de TCA. O TCA, quando presente nas rolhas de cortiça, mesmo em níveis muito reduzidos (ng/L) pode contaminar o vinho engarrafado, provocando-lhe um defeito organolético, o que origina graves e importantes perdas económicas no setor vinícola (Juanola, *et al.*, 2004).

Com efeito, o TCA é um composto aromático que pode estar presente na cortiça e que é caracterizado pelo seu cheiro/gosto a mofo característico. Uma vez que, no engarrafamento da maioria dos vinhos se usam rolhas de cortiça é fulcral que este composto não esteja presente na cortiça, ou caso exista, seja em quantidades inferiores ao limiar humano de deteção, de modo a garantir que a qualidade do vinho não se altera, e que este não apresenta cheiro a mofo, devido à migração do TCA da cortiça para o vinho. Sabe-se que este composto, mesmo em concentrações muito baixas (da ordem de 1 a 5 ng/L), pode ser detetado pelo paladar humano, conferindo ao vinho um “gosto a rolha”, atribuído à rolha de cortiça, o que é prejudicial tanto para o setor vinícola como para o setor corticeiro (Mazzoleni e Maggi, 2007). Por tal motivo, tem-se assistido a uma preocupação real do setor corticeiro no desenvolvimento de técnicas analíticas que permitam detetar precocemente esta situação e deste modo implementar ações corretivas

que tendam a reduzir o impacto negativo deste problema. Assim, técnicas como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa têm sido usadas como técnicas de referência por serem sensíveis ao ponto de detetar concentrações exíguas, ao nível dos picogramas. Contudo, são técnicas bastante dispendiosas, não acessíveis de um ponto de vista económico à maioria dos pequenos e médios produtores de cortiça.

A voltametria cíclica é uma das técnicas eletroquímicas mais simples existentes, afigurando-se uma alternativa para a deteção e quantificação de TCA, devido ao seu reduzido custo, fácil manuseamento, rapidez e elevada sensibilidade, com baixos limites de deteção.

1.2. OBJETIVO

Este trabalho tem como principal objetivo o estudo e desenvolvimento de uma nova metodologia de análise quantitativa, baseada numa técnica eletroquímica, voltametria cíclica, do teor de TCA presente em amostras de água de cozedura de pranchas de cortiça, provenientes do tratamento industrial das mesmas, passo prévio à produção de rolhas de cortiça. Esta metodologia pretende ser uma ferramenta alternativa aos métodos de referência utilizados na indústria, nomeadamente a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Esta última é uma técnica analítica dispendiosa e bastante morosa, que requer reagentes caros, que podem ter impacto ambiental negativo. O desafio deste trabalho é, por tal motivo, demonstrar a aplicabilidade da voltametria cíclica como um método de rotina para quantificar os níveis de TCA em amostras reais de água de cozedura de pranchas de cortiça, com sensibilidade similar à obtida por GC-MS.

1.3. ORGANIZAÇÃO DA TESE

A tese é organizada em cinco capítulos onde se descreve o trabalho realizado. O contexto e âmbito da tese são introduzidos neste capítulo.

No capítulo 2 é apresentada a revisão bibliográfica na qual é descrita a constituição da cortiça e o processo de produção da rolha. Realça-se, particularmente, o problema da contaminação do vinho por cloroanisois, entre os quais se pode destacar o TCA e descreve-se os princípios analíticos da técnica eletroquímica utilizada.

Os materiais e métodos utilizados para a realização deste estudo são apresentados no capítulo 3.

No capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos e discussão dos mesmos.

Por fim, as conclusões gerais retiradas deste estudo, assim como, sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no capítulo 5.

CAPÍTULO 2

A CORTIÇA: CONTAMINAÇÃO COM 2,4,6-TRICLOROANISOL

2. A CORTIÇA: CONTAMINAÇÃO COM 2,4,6-TRICLOROANISOL

Neste capítulo descreve-se a contribuição do setor corticeiro na economia nacional. Descreve-se ainda, de forma abreviada, o que é a cortiça e o processo de produção das rolhas, da qual se destaca a cozedura das pranchas de cortiça, uma vez que foi este o processo alvo de estudo neste trabalho de investigação. Também se explica o problema do gosto a mofo nas rolhas de cortiça, aroma característico do composto 2,4,6-tricloroanisol (TCA) e como o setor corticeiro é afetado pela sua presença na cortiça e no vinho. São ainda abordadas as metodologias analíticas para determinação do TCA no vinho e na cortiça, descritas na literatura e o novo método analítico proposto neste trabalho para essa mesma determinação.

2.1. CORTIÇA

A cortiça, casca dos sobreiros (*Quercus Suber L*), é um recurso vegetal nobre, uma vez que apresenta características únicas e especiais, muito procuradas na indústria vitivinícola, tais como baixa condutibilidade térmica, e elevada impermeabilidade, elasticidade, compressibilidade e leveza ($0,16 \text{ g/cm}^3$). Para além destas características, também se destaca a vantagem de ser um recurso natural renovável e reciclável (APCOR, 2004; Coque *et al.*, 2006; Prat *et al.*, 2011).

A cortiça é um material complexo composto por suberina (45%), polifenóis, como a lenhina e taninos (33%), polissacarídeos, nomeadamente celulose e hemicelulose (12%), ceras e vários compostos terpenóides (5%), e água, sais minerais e glicerina (5%) (Coque *et al.*, 2006).

Portugal é o país com maior área de sobreiro e apresenta 34% da área do montado de sobro mundial, correspondente a 736 mil hectares e 23% da área florestal nacional (dados referentes a 2010), estando a maioria localizada no Alentejo (84%). Existem cerca de 600 empresas do setor corticeiro que produzem cerca de 40 milhões de rolhas de cortiça por dia, situando-se a sua maioria no norte do país (APCOR, 2013a).

A produção de cortiça a nível mundial é superior a 201 mil toneladas. Portugal destaca-se no setor corticeiro como líder mundial na produção de cortiça e seus derivados com 49,6% (100 mil toneladas), assim como das exportações de cortiça, com uma quota de 64,7% do total mundial (APCOR, 2013a).

A cortiça é utilizada em diversos setores, entre os quais se destacam o setor vitivinícola e o setor da construção civil. Neste último, é usada para isolamento térmico e acústico, apoio antivibrátil, revestimentos de piso e paredes (interior e exterior). Tem sido também usada em novas aplicações de *design*, como peças decorativas para a casa, cadeiras, mesas, etc. e ainda peças de vestuário, calçado e acessórios de moda.

Portugal é o maior importador mundial de matéria-prima (pranchas de cortiça) com o objetivo de a transformar e de a exportar posteriormente sob a forma de produto final e o maior exportador de produtos de cortiça (845,7 milhões de euros em 2012) (APCOR, 2013a).

O principal produto exportado pelo setor corticeiro português são as rolhas de cortiça com 68,4% do valor das exportações, assumindo 578 milhões de euros, seguido da cortiça como material de construção com 27,5%, e os restantes 4,1% correspondem a exportações de cortiça como matéria-prima e outros. A nível nacional, as exportações portuguesas de cortiça representam 2% das exportações de bens portugueses e o setor apresenta um saldo positivo na balança comercial de 713,3 milhões de euros (APCOR, 2013a).

2.1.1. A produção de rolhas de cortiça

A cortiça recebe diversos tratamentos e passa por um conjunto de etapas, antes de ser transformada em rolha e ser colocada numa garrafa de vinho. Essas etapas diferem de acordo com o tipo de rolha que se deseja produzir, uma vez que existem oito categorias de rolhas de cortiça: rolha natural, rolha natural multipeça, rolha natural colmatada, rolha técnica, rolha de champanhe, rolha aglomerada e rolha capsulada (APCOR, 2010).

Os processos de produção das rolhas de cortiça regem-se por normas muito restritas definidas pelo Código Internacional das Práticas Rolheiras (CIPR) (Liège, 2011) que é

um conjunto de normas práticas para a fabricação de rolhas de cortiça, desenvolvido no início dos anos 90, pela Confederação Europeia da Cortiça em conjunto com sete países no âmbito do Projeto Quercus, que pretendia estudar os desvios sensoriais relacionados com o aroma/gosto a mofo no vinho. As empresas devem operar de acordo com o descrito no CIPR, para controlar e uniformizar todo o processo desde a preparação da matéria-prima até aos acabamentos, podendo desta forma obter a certificação internacional *Systecode* que atesta que a empresa cumpre aquele referencial normativo (APCOR, 2011b).

A Figura 2.1 mostra o montado, o processo de descortiçamento do sobreiro (à direita) e as pilhas de pranchas de cortiça no montado e em estaleiro (à esquerda).



Figura 2.1 Montado e descortiçamento (adaptado de Amorim, 2012; Silva, 2012).

Após o descortiçamento do sobreiro, as pranchas de cortiça são empilhadas no montado ou em estaleiro, na fábrica preparadora, num processo designado por estabilização que tem como objetivo permitir a secagem da seiva, a redução de humidade e a oxidação de compostos fenólicos. De acordo com o CIPR, o tempo de estabilização nunca deverá ser inferior a seis meses (Liège, 2011).

Depois da estabilização procede-se à cozedura das pranchas em água limpa fervente (a 100 °C) ou a uma temperatura ligeiramente superior, quando sob pressão, durante 60 minutos, com o objetivo de limpar a cortiça, extrair substâncias hidrossolúveis, aumentar a espessura da cortiça e reduzir a sua densidade e torná-la mais macia e elástica. Esta etapa constitui um processo de extração sólido-líquido dos compostos hidrossolúveis da cortiça, originando um efluente líquido rico em taninos e outros constituintes (APCOR, 2010).

A Figura 2.2 mostra a etapa de cozedura das pranchas de cortiça.



Figura 2.2 Cozedura da cortiça (adaptado de Amorim, 2012; Silva, 2012).

Depois da estabilização pós-cozedura é fabricada a rolha, que será então sujeita a um conjunto de atividades que envolvem retificação dimensional, desinfecção, lavagem, seleção e acabamento (Coque *et al.*, 2006 ; APCOR, 2013b).

A Figura 2.3 apresenta de forma esquemática as diversas etapas à qual a casca do sobreiro (cortiça) é sujeita desde a sua entrada na indústria em forma de prancha até ser transformada no produto final, a rolha de cortiça.

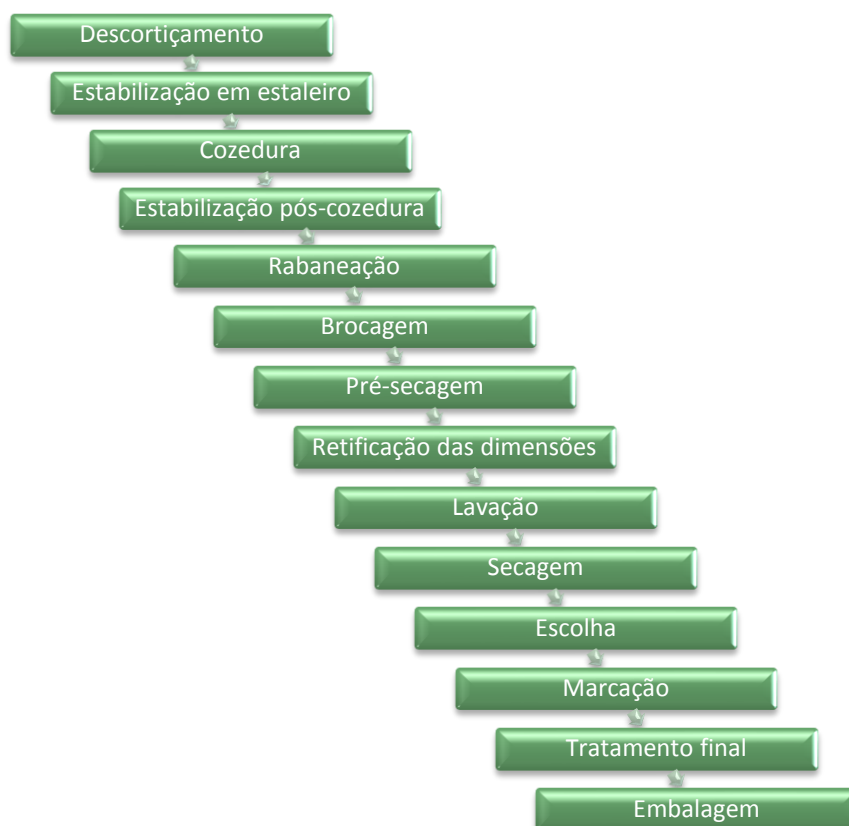


Figura 2.3 Esquema do processo de transformação da casca do sobreiro (cortiça) em rolha (adaptado de Silva, 2012).

2.1.2. O problema do “gosto a rolha”

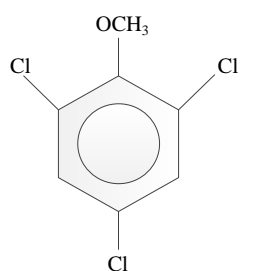
No setor industrial vitivinícola, é possível constatar a existência de um defeito organolético nos vinhos que pode ter consequências economicamente desfavoráveis (Maggi *et al.*, 2008), sendo uma grande ameaça ao setor. Este defeito tem origem num composto químico que pode estar presente nas rolhas de cortiça. A sua presença no vinho resulta na perda dos seus aromas naturais dando lugar a um aroma desagradável a “mofo” que muitas vezes é também denominado por “gosto a rolha”, de forma errónea, pelo facto de estar frequentemente associado à rolha de cortiça (Pereira *et al.*, 1999; Ezquerro *et al.*, 2006) embora já tenha sido identificada esta alteração organolética em bebidas que não estiveram em contacto com rolhas de cortiça (Chatonnet *et al.*, 2004; Sefton e Simpson, 2005).

O problema do aroma a mofo está relacionado, geralmente, com a migração de compostos, que podem ter origem em microrganismos presentes na rolha de cortiça, para o vinho (Pereira *et al.*, 1999). Têm sido identificados diversos compostos que podem ser responsáveis por alterações organoléticas no vinho, tais como cloroanisóis, guaiacol, 1-octeno-3-ol, 1-octeno-3-ona, geosmina, 2-metil-isoborneol, 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina, 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA), 2,3,4,5,6-pentacloroanisol (PCA), 2,4,6-tribromoanisol (TBA) e o TCA (Riu *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2004; Coque *et al.*, 2006; Maggi *et al.*, 2008; Patil *et al.*, 2011; Varelas *et al.*, 2011). Este último, o 2,4,6-tricloroanisol é considerado o principal responsável pelo desvio organolético do vinho associado ao aroma a mofo (Moore *et al.*, 2003; Ezquerro *et al.*, 2006) que inevitavelmente terá influência negativa nas propriedades organoléticas e sensoriais do produto vitivinícola, conferindo-lhe aquele aroma desagradável, mesmo quando em concentrações muito baixas, da ordem dos 2 a 4 ng/L (Coque *et al.*, 2006).

2.2. FORMAÇÃO DO TCA

O TCA é um haloanisol derivado do metoxibenzeno (anisol), que tem na sua estrutura química três átomos de cloro (Figura 2.4). É um metabolito que pode ser formado quando determinados fungos são expostos aos seus precursores, os triclorofenóis. Uma vez que os

funfos estão frequentemente presentes na cortiça, este fenómeno pode ocorrer em qualquer altura da produção das rolhas de cortiça, desde a cortiça que ainda se encontra no sobreiro até ao momento em que o vinho já está armazenado em caves (Mazzoleni e Maggi, 2007). O TCA pode também desenvolver-se em qualquer local propício ao desenvolvimento fúngico que se encontre contaminado com clorofenóis.



2,4,6-tricloroanisol (TCA)

Figura 2.4 Estrutura química do 2,4,6-tricloroanisol (TCA) (adaptado de Coque *et al.* 2006).

O composto é volátil e rapidamente adsorvido por materiais como a cortiça e a madeira (Coque *et al.*, 2006), podendo a cortiça também funcionar como meio de transferência do TCA formado noutros locais, como por exemplo nas caves, para o vinho. Assim, a contaminação dos vinhos por TCA pode não ter origem unicamente na rolha de cortiça, mas também na cave e durante o processo de transporte e manuseamento da rolha, já fora da unidade corticeira (Patil *et al.*, 2011; Varelas *et al.*, 2011).

Constituindo a contaminação direta ou indireta da cortiça com o TCA um dos principais problemas que afetam o setor corticeiro, torna-se relevante prevenir tal fenómeno, recorrendo a técnicas de análise capazes de detetar a sua existência e prevenir a sua chegada ao produto final de forma a evitar perdas económicas elevadas relacionadas com o defeito organolético no vinho devido à presença deste composto.

Conforme se referiu, a presença de TCA na cortiça deve-se maioritariamente à biometilação (ou *O*-metilação) do 2,4,6-triclorofenol (TCP), que é um dos precursores do 2,4,6-tricloroanisol (TCA) (Figura 2.5) (Miki *et al.*, 2005; Coque *et al.*, 2006).

A biometilação é uma reação química, promovida por fungos filamentosos (estirpe *Trichoderma longibrachiatum*, principalmente) frequentemente presentes nas pranchas de cortiça, provenientes do montado, ou nas peças de madeira, presentes nas caves/adegas, que tem por base um processo de desintoxicação. Devido à elevada toxicidade dos clorofenóis, tal como o TCP, para os microrganismos, os fungos adquiriram mecanismos

de resistência que lhes permitem converter o TCP em TCA (não tóxico) através da produção e segregação de uma enzima oxidativa, Clorofenol *O*-metiltransferase (CPOMT) que efetua essa mesma conversão. No entanto, nem o TCA nem o TCP são tóxicos para os humanos, nas concentrações que são normalmente encontradas nas bebidas (Miki *et al.*, 2005; Coque *et al.*, 2006; Mazzoleni e Maggi, 2007).

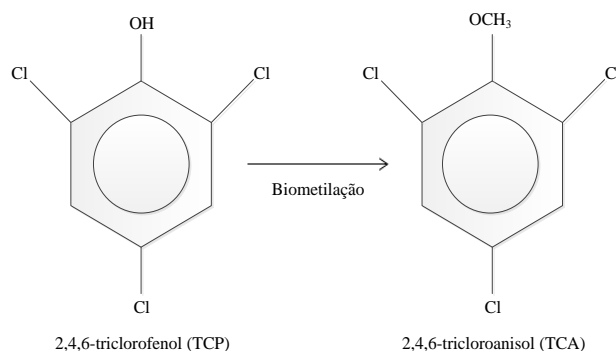


Figura 2.5 Representação das estruturas químicas do TCP e TCA (adaptado de Coque *et al.*, 2006).

2.3. CONTROLO DE QUALIDADE NA CORTIÇA

Com a informação que se dispõe hoje em dia sobre o TCA, pode ter-se um maior controlo sobre o processo de fabrico das rolhas de cortiça para engarrafamento de vinho.

Neste ponto, pretende-se enquadrar os procedimentos de controlo de qualidade com as metodologias analíticas de quantificação de TCA existentes atualmente.

2.3.1. Metodologia analítica para determinação do TCA

Pelo facto de existir uma crescente exigência do consumidor e da sua preferência pelo vinho com elevada qualidade, a rolha de cortiça é obrigada a colocar-se numa categoria mais exigente onde a sua qualidade é de relevante importância. Deste modo, a indústria de rolhas de cortiça apetrecha-se atualmente com os melhores equipamentos de forma a oferecer o produto em condições de acabamento à medida das exigências do mercado

(Coque *et al.*, 2006). Torna-se evidente que o controlo de qualidade nas rolhas de cortiça, quanto à presença de TCA libertável durante o seu processo de fabrico, deva ser o foco da atenção destas empresas, de modo a garantir que o vinho não sofrerá qualquer alteração organolética anormal no seu estágio de envelhecimento, com origem neste composto aromático.

O TCA pode ser detetado em diversas etapas do processo de fabrico das rolhas de cortiça. Durante o processo de fabrico das rolhas pode ser analisada a água de cozedura das pranchas de cortiça para detetar o TCA libertável e também a água de lavagem das rolhas. Outras análises podem ser realizadas posteriormente ao vinho, assim como, às rolhas de cortiça em qualquer das fases da sua produção, sendo frequentemente realizadas ao produto final (após maceração).

O controlo de qualidade das rolhas de cortiça no que se refere à determinação do TCA é sustentado na norma ISO 20752:2007 e no método OIV-MA-AS315-16. Estes métodos para preparação de amostras para quantificação de TCA têm por base o equilíbrio sólido-líquido. Permitem determinar a concentração de TCA libertável (na cortiça ou nas rolhas de cortiça) que migraria para o vinho durante o envelhecimento, através de extração sólido-líquido seguida de cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS) ou cromatografia gasosa com deteção por captura de eletrões (GC-ECD). As amostras são previamente sujeitas a maceração numa solução aquosa de etanol a 12% (v/v), solução que pretende simular o vinho (ISO, 2007; OIV, 2012). Estes métodos e normas têm como finalidade principal harmonizar as técnicas de quantificação do TCA no setor corticeiro.

O limite de perceção sensorial do TCA no vinho varia não só de acordo com o consumidor, como também consoante o tipo de vinho, a ocasião em que é consumido, etc. No entanto, este composto é detetado pelo paladar humano em concentrações exíguas, da ordem dos nanogramas por litro (APCOR 2011b).

Os valores encontrados na bibliografia para estes limites diferem de autor para autor. Vestner *et al.* (2010) referem que o limite sensorial é de cerca de 4 ng/L (no vinho) e Juanola *et al.* (2004) referem 5 ng/L. Sefton e Simpson (2005) referem que o limite de deteção pode estar compreendido entre 1,4 e 4,6 ng/L e o limite de reconhecimento entre 4,2 e 10 ng/L. Fontana *et al.* (2010) afirmam que o limite de perceção do TCA é superior a 0,03 ng/L.

Em vinhos cujos aromas têm características da madeira na qual se processou o seu envelhecimento, ou que permaneceram bastante tempo na garrafa (vinhos velhos) ou mesmo em vinhos que contenham algum tipo de oxidação, a capacidade humana de percepção sensorial do gosto a rolha é mais difícil em virtude da dissimulação deste defeito pelos aromas a madeira (Sefton e Simpson, 2005; Mazzoleni e Maggi, 2007). A deteção do gosto a rolha nos vinhos brancos ocorre a concentrações mais baixas do que nos vinhos tintos (Sefton e Simpson, 2005).

Devido à complexidade da matriz das amostras e à baixa concentração de TCA nelas contida, é muitas vezes necessário proceder-se à preparação das amostras, recorrendo a pré-concentrações ou extrações (Fontana, 2012; Pizarro *et al.*, 2012). Muitas técnicas têm sido comumente utilizadas para pré-concentração das amostras para a determinação do TCA. Entre estas técnicas podem destacar-se a microextração em fase sólida (SPME) (Soleas *et al.*, 2002; Martínez-Uruñuela *et al.*, 2004; Martínez-Uruñuela *et al.*, 2005; Insa *et al.*, 2005; Pizarro *et al.*, 2007a; Pizarro *et al.*, 2007b; Campillo *et al.*, 2008), pervaporização (Gómez-Ariza *et al.*, 2004), extração por fluido pressurizado (Gómez-Ariza *et al.*, 2005), extração por adsorção com recurso a uma barra de agitação (SBSE) (Hayasaka *et al.*, 2003), microextração de gota única (SDME) (Martendal *et al.*, 2007), microextração dispersiva líquido-líquido (Campillo *et al.*, 2010; Pizarro *et al.*, 2010), microextração assistida por emulsificação com ultrassons (Regueiro *et al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2010), extração assistida por micro-ondas (MAE) (Vestner *et al.*, 2010) e extração assistida por micro-ondas combinada com microextração dispersiva líquido-líquido (Pizarro *et al.*, 2012).

Para detetar a presença de TCA em vinhos, Juanola *et al.* (2004) recorreram à cromatografia gasosa com deteção por captura de eletrões (GC-ECD), após realizar microextração em fase sólida (SPME) o que permitiu quantificar concentrações de TCA entre 0,63 e 219,76 ng/L. Márquez-Sillero *et al.* (2011) conseguiram quantificar TCA em vinho através de microextração de gota única por líquido iónico (IL-SDME), acoplada à separação em coluna multicapilar (MCC) com deteção por espectrometria de mobilidade iónica (IMS), com um limite de deteção de 0,01 ng/L.

Em 2011, Patil *et al.* desenvolveram um método de preparação de amostras simples, rápido, eficiente, preciso e barato, que se baseia em extração dispersiva de fase sólida (DSPE) com recurso a cromatografia gasosa com espectrometria de massa para detetar o

TCA em vinhos brancos e tintos com um limite de detecção inferior a 10ng/L. Karpas *et al.* (2012) utilizaram espectrometria de mobilidade iónica para detetar a presença de TCA em amostras de vinho após etapas de pré-concentração e pré-separação. Schmarr *et al.* (2012) mostraram que a extração em fase sólida seguida de GC-MS multidirecional pode ser usada para determinar TCA em concentrações inferiores a 1 ng/L.

Relativamente à determinação do TCA na cortiça, o número de trabalhos publicados é inferior aos publicados sobre TCA em vinho. Para quantificar o TCA libertável em rolhas de cortiça Juanola *et al.* (2004) analisaram amostras de rolhas de cortiça não contaminadas e naturalmente contaminadas, após realizar extração com *n*-pentano, tendo quantificado concentrações de TCA entre 0,08 e 105,01 µg/kg. Ezquerro *et al.* (2006) determinaram a quantidade de TCA e guaiacol em rolhas de cortiça extraíndo esses compostos com fluido pressurizado e analisando por GC-MS em três tipos de amostras de rolhas de cortiça naturalmente contaminadas obtendo um desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre 10% e 20%. Vestner *et al.* (2010) utilizaram extração assistida por micro-ondas (MAE) combinada com extração por adsorção com recurso a uma barra de agitação (SBSE) para analisar TCA nas amostras de rolhas de cortiça, usando uma técnica de GC-MS otimizada por uma análise por diluição de isótopo estável (SIDA) que analisa o TCA livre marcado com deutério, com um limite de detecção de 0,5 ng/L.

Novas técnicas têm sido propostas para quantificar o TCA em vinho. Moore *et al.* (2003) desenvolveram um biossensor que tem por base elétrodos impressos para detetar quantitativamente TCA em matrizes tamponadas com um limite de detecção de 29 ng/L, mas que não foi eficaz com as amostras de vinho. Duarte *et al.* (2009) propuseram a detecção de TCA em amostras tamponadas através de imunossensores de deslocamentos eletroquímicos, mas com elevados limites de detecção, da ordem dos 200 µg/L. Como se pode verificar, a gama de detecção deste composto halogenado nestes novos métodos encontra-se acima do limite de detecção sensorial humano de TCA no vinho. No entanto, Varelas *et al.* (2011) desenvolveram um biossensor rápido (3 a 5 minutos) e de baixo custo para monitorizar baixas concentrações de TCA, de 1,02 a 12 ng/L, testado na análise de amostras de TCA em vinho branco e TCA extraído de cortiça embebida em vinho branco.

Refira-se que todos estes métodos analíticos se encontram para além das possibilidades económicas da maioria dos produtores de rolhas de cortiça que, muitas das

vezes, são microempresas (55%) e pequenas empresas (27%) (algumas familiares) que apenas analisam um reduzido número de amostras do produto final (dados relativos às 254 empresas associadas da APCOR em 2013 (APCOR, 2013a)).

Neste estudo, foi utilizada uma técnica de análise eletroquímica quantitativa, que ainda não tinha sido testada até então. Essa técnica baseia-se na voltametria cíclica.

Seguidamente é apresentada a tabela 2.1 onde se encontra um resumo das principais técnicas descritas na literatura e o tipo de amostras analisadas.

Tabela 2.1 Resumo das principais técnicas e limites de deteção descritos na literatura.

Autor	Amostra	Técnica		Limite de Deteção
		Extração	Deteção/Quantificação	
Soleas et al. (2002)	Vinho	SPME	GC-MS	0,1 ng/L
Hayasaka et al. (2003)	Vinho	SBSE	GC-MS	—
Moore et al. (2003)	Matriz tamponada	—	Biossensor	29 ng/L
Juanola et al. (2004)	Vinho	HS-SPME	GC-ECD	0,63 – 219,76 ng/L
	Rolhas de cortiça	Extração com Pentano		0,08 – 105,01 µg/kg
Gómez-Ariza et al. (2004)	Vinho	Pervaporação	GC-MS/MS	25,8 ng/L
			CT-TD-GC-MS/MS	4,2 ng/L
Martínez-Uruñuela et al. (2004)	Vinho	HS-SPME	GC-ECD	—
Martínez-Uruñuela et al. (2005)	Vinho tinto	SPE	GC-MS	0,2 – 2,4 ng/L
Gómez-Ariza et al. (2005)	Cortiça	Extração por fluido pressurizado	GC-µECD + GC-MS-MS	—
Sefton e Simpson (2005)	Vinho	—	Paladar humano	1,4 – 4,6 ng/L
Insa et al. (2005)	Vinho	SPE	GC-IT-MS	0,2 ng/L
Ezquerro et al. (2006)	Rolhas de cortiça	Extração por fluido pressurizado	GC-MS	10 – 20% (DPR%)
Martendal et al. (2007)	Vinho	HS-SDME	GC-ECD	8,1 ng/L

Tabela 2.1 Resumo das principais técnicas e limites de detecção descritos na literatura (continuação).

Autor	Amostra	Técnica		Limite de Detecção
		Extração	Deteção/Quantificação	
Pizarro <i>et al.</i> (2007a)	Vinho	HS-SPME+MSTFA	GC-ECD	—
Pizarro <i>et al.</i> (2007b)	Rolhas de cortiça	MAE	GC-ECD	—
Campillo <i>et al.</i> (2008)	Vinho	HS-SPME	GC-AED	1,2 – 18,5 ng/L
Duarte <i>et al.</i> (2009)	Matriz tamponada	—	Imunossensores de deslocamentos eletroquímicos	200 µg/L
Campillo <i>et al.</i> (2010)	Vinho	DLLME	GC-MS	4 – 108 ng/L
Fontana <i>et al.</i> (2010)	Vinho	US-ME	GC-MS	0,6 – 0,7 ng/L
Pizarro <i>et al.</i> (2010)	Vinho	DLLME	GC-ECD	—
Vestner <i>et al.</i> (2010)	Rolhas de cortiça	MAE + SBSE	GC-MS-SIDA	0,5 ng/L
Márquez-Sillero <i>et al.</i> (2011)	Vinho	HS-IL-SDME + MCC	IMS	0,01 ng/L
Patil <i>et al.</i> (2011)	Vinho	DSPE	GC-MS	<10 ng/L
Varelas <i>et al.</i> (2011)	Vinho branco	Cortiça em vinho branco	biossensor	1,02 -- 12 ng/L
Karpas <i>et al.</i> (2012)	Vinho	—	IMS	2,1 µg (papel filtro)
Schmarr <i>et al.</i> (2012)	Vinho	SPE	GC-MS multidirecional	1,7 mg/L (fase gasosa)
Schmarr <i>et al.</i> (2012)	Vinho	SPE	GC-MS multidirecional	<1 ng/L
Pizarro <i>et al.</i> (2012)	Rolhas de cortiça	MAE+ DLLME	GC-ECD	—

2.3.2. Voltametria

A voltametria é um método analítico eletroquímico que permite medir e interpretar a relação entre a corrente e o potencial elétrico durante a eletrólise de uma espécie química presente numa célula eletroquímica durante um determinado período de tempo. As informações qualitativas e quantitativas são obtidas pelo registo de curvas corrente-potencial, resultantes da medição simultânea das duas grandezas físicas. Esta é uma característica comum a todas as técnicas voltamétricas (Skoog *et al.*, 1996; Settle, 1997; Mendham *et al.*, 2002).

A célula eletroquímica usada em voltametria é constituída por três elétrodos, sendo eles o elétrodo de trabalho (ET), o elétrodo de referência (ER) e um elétrodo auxiliar, o contra-elétrodo (CE). O potencial é aplicado entre o elétrodo de trabalho e o elétrodo de referência, a uma velocidade de varrimento constante, relativamente ao tempo. As curvas que se obtêm designam-se por voltamogramas (Skoog *et al.*, 1996; Mendham *et al.*, 2002).

A Figura 2.6 representa esquematicamente o circuito de potencial elétrico controlado no qual se baseia a voltametria cíclica com três elétrodos.

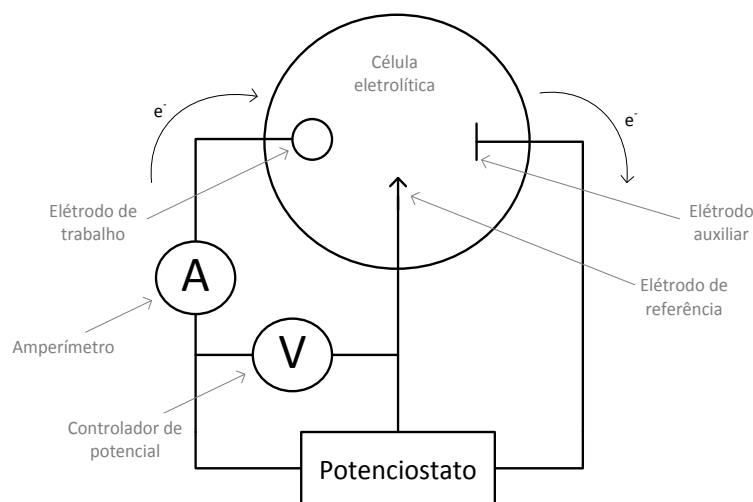


Figura 2.6 Esquema simplificado do circuito de potencial controlado usado em voltametria com três elétrodos (adaptado de Harris, 2007).

A voltametria é muito utilizada, nomeadamente em estudos de processos de oxidação e redução, processos de adsorção em superfícies, mecanismos de transferência de eletrões em superfícies de elétrodos quimicamente modificados, cinéticas de processos de

transferência de eletrões, entre outros (Skoog e Leary, 1992; Skoog *et al.*, 1996;1 Settle, 1997).

Comummente, esta técnica envolve a oxidação ou redução de substâncias em solução, dependendo da polaridade do potencial aplicado, permitindo a identificação de espécies ativas. O potencial aplicado exerce uma alteração na concentração da espécie eletroquímica à superfície do ET ao reduzir ou oxidar a espécie electroquimicamente. No entanto, os resultados apenas são reprodutíveis em determinadas condições, nomeadamente, quando o ET se encontra completamente polarizado, permitindo que a corrente que o atravessa seja proporcional à concentração da espécie. Por este motivo, o ET apresenta uma área superficial muito mais pequena do que o ER (Skoog e Leary, 1992; Skoog *et al.*, 1996; Settle, 1997; Mendham *et al.*, 2002).

Em voltametria é usado um potencial (E) variável que promove a excitação da célula eletroquímica, que dará uma resposta em corrente elétrica (I) característica da espécie química. As ondas podem tomar diferentes formas dependendo do sinal de excitação usado em voltametria. Os sinais mais vulgarmente utilizados são linear, em pulso, onda quadrada e triangular (Skoog e Leary, 1992; Skoog *et al.*, 1996). No presente trabalho foi utilizada a voltametria de onda triangular, também designada por voltametria cíclica.

Esta técnica analítica tem diversas vantagens, entre as quais se podem destacar o baixo custo, a rapidez da análise, a sensibilidade da técnica, bem como o facto de a medição poder ser efetuada recorrendo a uma corrente elétrica reduzida (da ordem dos μA), e de poderem ser usados diversos analitos e solventes numa ampla escala de temperaturas (Settle, 1997).

2.3.2.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica simples e direta, de varrimento rápido de potencial de onda triangular, bastante usada no estudo de processos de oxidação-redução. Nesta técnica, o varrimento é feito em dois sentidos, a uma velocidade de varrimento constante e conhecida, permitindo desta forma o estudo de reações

eletroquímicas diretas e inversas, através da observação de picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa (Ewing, 1987; Skoog *et al.*, 1996; Wang, 2001).

Em voltametria cíclica, é aplicado um potencial de onda triangular variável ao ET. Como se pode verificar pelo esquema da Figura 2.7, o varrimento ocorre em duas direções. Entre os tempos t_0 e t_1 é aplicada um potencial que inverte o sentido em t_1 , quando atinge um dado potencial, retornando em seguida ao valor inicial de potencial, no tempo t_2 .

Dependendo da composição da amostra, a direção do varrimento inicial pode ser positiva ou negativa. Um varrimento direcionado para valores de potencial mais negativos é designado por varrimento normal (ou *forward scan*), enquanto o varrimento na direção oposta é denominado por varrimento inverso (*reverse scan*) (Skoog e Leary, 1992; Settle, 1997; Mendham *et al.*, 2002; Harris, 2007).

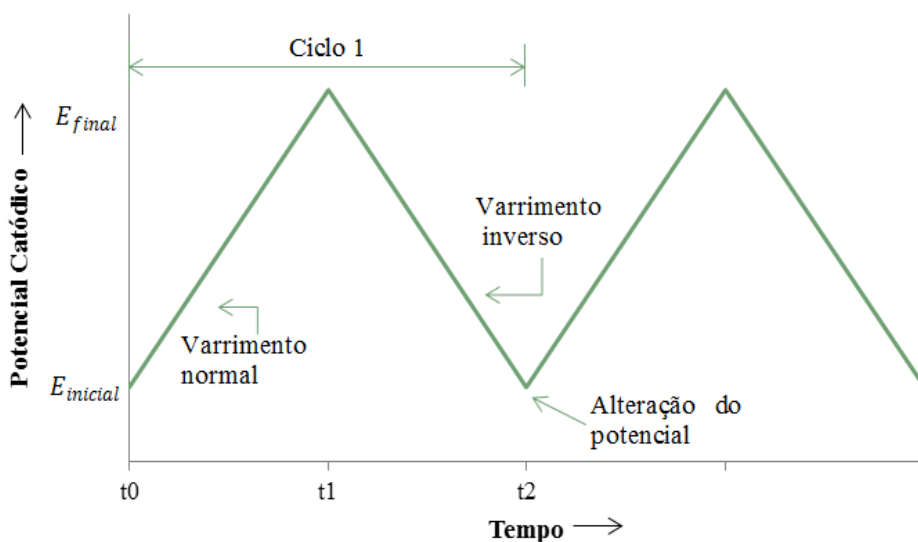
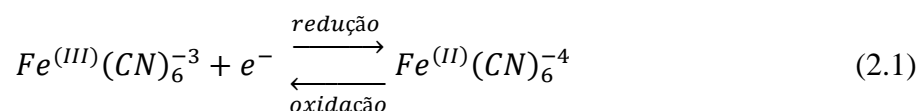


Figura 2.7 Esquema do potencial de onda triangular da voltametria cíclica (adaptado de Wang, 2001).

Esta técnica é provavelmente a mais versátil para estudar espécies eletroativas e podem ser definidos três tipos de processos: reversível, irreversível e quase-reversível (Wang, 2001). Como exemplo, a seguir mostra-se o voltamograma obtido para a reação redox reversível tal como:



cujo complexo Fe (III) é reduzido a Fe (II) (Settle, 1997).

O processo realiza-se em soluções sem agitação, com elétrodos com pequena área superficial, podendo o ciclo ser repetido quantas vezes forem necessárias.

Pela Figura 2.8 verifica-se que após o varrimento ser iniciado, ocorre um aumento na intensidade de corrente I ao atingir um determinado potencial E que corresponde à diminuição da concentração de $Fe^{(III)}(CN)_6^{-3}$ que está a ser reduzido a $Fe^{(II)}(CN)_6^{-4}$ à superfície do ET. Depois da inversão do varrimento ocorre a reação de oxidação (ver equação 2.1) (Skoog e Leary, 1992). No voltamograma evidenciam-se os picos catódico e anódico: I_{pa} representa o pico anódico da intensidade de corrente de oxidação, I_{pc} o pico catódico da intensidade de corrente de redução e E_{pa} e E_{pc} representam, respetivamente, o pico anódico de potencial e o pico catódico de potencial.

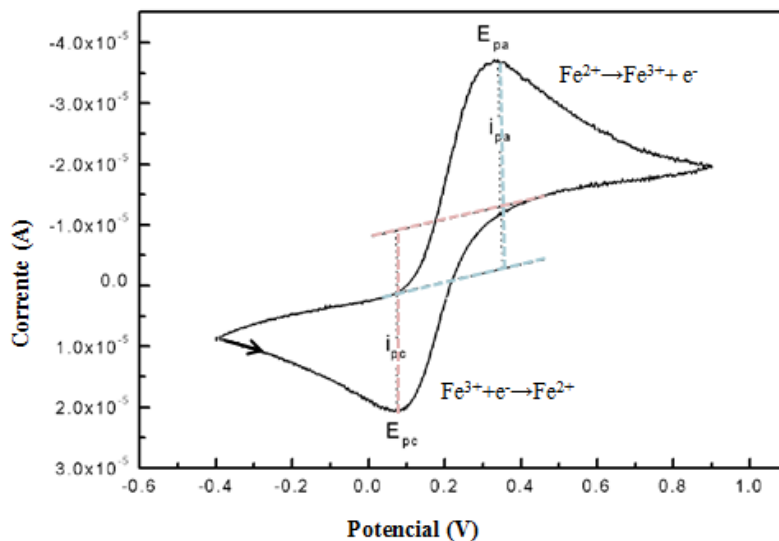


Figura 2.8 Voltamograma cíclico representativo dos picos de corrente e potencial do ferrocianeto (adaptado de Wang *et al.*, 2000).

Se a cinética da reação de oxidação for lenta, as ondas catódica e anódica afastam-se uma da outra e para reações irreversíveis o pico anódico é praticamente impercetível. A Figura 2.9 mostra a alteração no aspeto visual do voltamograma cíclico para os sistemas quase-reversíveis e irreversíveis.

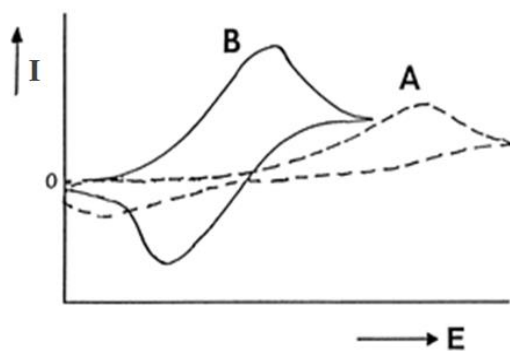


Figura 2.9 Voltamograma cíclico para um processo redox irreversível (curva A) e quase-reversível (curva B) (adaptado de Wang, 2001).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentado o material e os métodos de preparação das soluções e amostras utilizados nas diversas experiências efetuadas.

Foram realizadas experiências com o intuito de estabelecer as condições experimentais de análise ideais (uma vez que se pretendia uma metodologia de análise económica e “verde”) tendo em conta o objetivo primordial de realizar ensaios voltamétricos, em matrizes aquosas. Assim, tiveram-se em atenção os seguintes pontos:

- (i) Estabelecimento da proporção volumétrica relativa de solvente orgânico (acetonitrilo, ACN) na solução aquosa final e sua influência no voltamograma cíclico obtido para uma concentração pré-definida de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) (10 mg/L);
- (ii) Avaliação da resposta do sistema ao incremento da concentração de TCA em solução (entre 0 e 3,4 mg/L);
- (iii) Influência da presença ou ausência de um eletrólito forte de suporte (perclorato de tetrabutylamónio, TBAP) na solução de análise;
- (iv) Repetibilidade do sinal do ensaio em branco para as condições finais estabelecidas para a solução de análise, no mesmo dia e entre dias;
- (v) Estabelecimento de curvas de calibração para a quantificação de TCA em soluções padrão (ACN/água) pelo método da adição de padrão e obtenção dos respetivos limites de deteção e quantificação;
- (vi) Estudo da repetibilidade, precisão e exatidão da análise por voltametria cíclica para as amostras de água de cozedura das pranchas de cortiça.

3.1. ESCOLHA DO EQUIPAMENTO E SOLVENTES

Para analisar um componente aromático presente nas rolhas de cortiça resultante da biometilação do 2,4,6-triclorofenol (TCP), o 2,4,6-tricloroanisol (TCA), pretendia-se encontrar um método económico que permitisse obter resultados equivalentes aos obtidos

através dos métodos convencionais já referidos, tendo-se optado pela voltametria cíclica. Deste modo, utilizou-se um equipamento de análise eletroquímica com três eléctrodos (eléctrodo de trabalho (ET), eléctrodo de referência (ER) e contra-eléctrodo (CE)) que promoveriam a eletrólise da espécie química a analisar.

Comummente são utilizados para voltametria cíclica eléctrodos de platina (Pt) e/ou de prata (Ag). Neste caso, depois de verificar o sinal obtido usando eléctrodos de platina como ET e CE e eléctrodo de prata como ET e de platina como CE, optou-se pela última configuração, pelo facto de estar reportado que este conjunto apresenta uma elevada atividade eletrocatalítica na redução de compostos orgânicos halogenados (Mele e Bozzini, 2009).

O acetonitrilo foi utilizado como solvente por ser um solvente orgânico aprótico, ou seja, não cede iões de hidrogénio durante uma reação ácido-base, sendo conveniente neste caso pelo facto de não interferir com a amostra a analisar, uma vez que esta última se trata de uma matriz complexa de compostos orgânicos, para além do facto de o TCA e o TBAP (utilizado como eletrólito de suporte) apresentarem uma baixa solubilidade em água. É também o solvente geralmente utilizado em voltametria cíclica e em cromatografia. Como referido, foi também utilizado o TBAP como eletrólito forte de suporte para permitir contornar o fenómeno de eletrodeposição metálica, que ocorre devido à exposição do eléctrodo de prata ao acetonitrilo. Escolheu-se o TBAP por ser um sal quaternário, cujos catiões de tetrabutilamónio, em soluções com alto teor orgânico, são adsorvidos no eléctrodo de prata, comportando-se como “refinadores” dos aglomerados metálicos resultantes do efeito da eletrodeposição, tornando as partículas mais pequenas (Harris, 2007; Mele e Bozzini, 2009).

O eléctrodo de referência utilizado foi um eléctrodo de referência de junção dupla de Ag/AgCl constituído por um filamento de prata recoberto com AgCl sólido que está submerso numa solução externa saturada de cloreto de potássio (KCl a 3M) em contacto através de uma membrana porosa que se encontra em contacto com a solução analítica. Pelo facto de este tipo de eléctrodo apresentar uma segunda membrana porosa, é possível usar um eletrólito diferente em contacto com a amostra e eliminar a interferência de certos iões como por exemplo, o ião cloreto (Harris, 2007), embora não tenha sido o caso.

3.2. REAGENTES

Os reagentes utilizados nas experiências foram o 2,4,6-tricloroanisol (TCA) da *Sigma-Aldrich*, com 99% de pureza, acetonitrilo da *Merck*, com 99,8% de pureza, perclorato de tetrabutylamónio (TBAP) da *Fluka*, com 99% de pureza. Cloreto de sódio (NaCl) da *Sigma-Aldrich* com pureza mínima de 99,8% e 2,4,6-tricloroanisol deuterado (TCA-d5) obtido através de *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.* com pureza mínima de 98%. A água desionizada usada neste trabalho foi do tipo II e obtida através do sistema de purificação de água TGI.

3.3. AMOSTRAS

Para as experiências realizadas foram utilizadas várias amostras de água de cozedura de cortiça provenientes da M. A. Silva, indústria portuguesa de produção de rolhas de cortiça, recolhidas durante o ano de 2012, nos meses de janeiro, abril, julho e setembro. Estas foram recolhidas de acordo com a rotina normal de controlo de qualidade estabelecido pela empresa, durante o processo de cozedura das pranchas de cortiça. Em experiências preliminares usaram-se amostras de água de cozedura não caracterizadas nem analisadas através de GC-MS. Na validação do método analítico usaram-se vinte e duas amostras distintas que foram analisadas paralelamente por GC-MS no laboratório da empresa.

Todas as amostras foram utilizadas tal e qual como foram recebidas, sem terem sofrido qualquer tipo de tratamento, não se tendo procedido a qualquer etapa de filtração, extração ou concentração. Foram conservadas à temperatura de 4°C até serem utilizadas tendo sido armazenadas em frascos de vidro âmbar em local protegido da luz.

3.4. METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DO 2,4,6-TRICLOROANISOL

Cada uma das amostras de água de cozedura foi dividida e quantificada em termos de TCA em paralelo por GC-MS de acordo com o estipulado pela norma ISO 20752:2007 pelo laboratório da empresa M. A. Silva e por voltametria cíclica (VC), no âmbito do presente projeto.

3.4.1. Análise por GC-MS

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS), método de referência utilizado na empresa produtora de rolhas de cortiça, com o intuito de validar os resultados obtidos por voltametria cíclica e assim validar este novo método de análise quantitativa.

O TCA presente nas amostras de água de cozedura das pranchas de cortiça foi quantificado por GC-MS, de acordo com o descrito na norma ISO 20752:2007 (ISO, 2007) e na Resolução OIV 296/2009 (OIV, 2012), através de microextração em fase sólida (SPME) com 100 µm de fibra de polidimetilsiloxano seguida de cromatografia gasosa. O aparelho de cromatografia utilizado foi um *Thermo Trace GC Ultra*, com coluna TG-5MS (coluna capilar de fenilmetilpolissiloxano a 5%) com detecção por espectrometria de massa (*Thermo ISQ*). Para poder quantificar o TCA foi necessário recorrer a um método de calibração com padrão interno. Para tal, foi preparada uma solução de etanol a 12% contendo TCA-d5 para ser usada como padrão interno nas soluções padrão de TCA de concentrações a variar entre 0,5 e 50 ng/L.

As amostras de água de cozedura das pranchas de cortiça foram colocadas em *vials*, contendo todos a mesma quantidade de amostra, para que ocupassem apenas metade da capacidade total do *vial* por forma a evitar contacto entre a fibra do SPME e a fase líquida. Antes de serem fechados e colocados para análise, adicionou-se NaCl aos *vials* até à saturação, para facilitar o processo de extração, e também o padrão interno (solução de TCA-d5). A fibra adsorve os vapores libertados pela amostra durante 30 minutos a $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Seguidamente foi colocada a fibra no injetor do GC para ser realizada a

desadsorção durante 15 minutos a 260°C. O hélio foi utilizado no GC como corrente gasosa de arrastamento a um fluxo contante de 1 mL/min.

Para quantificar o TCA, a área do pico cromatográfico foi corrigida considerando a área do pico do padrão interno. A detecção foi feita no modo MS/MS, com detecção de três íons e quantificação do íon mais abundante tendo como íon precursor e íon produto, os íons m/z 217 e 199 para o TCA-d5 e os íons m/z 212 e 197 para o TCA.

3.4.2. Análise por voltametria cíclica

As análises de voltametria realizaram-se em soluções sem agitação. Neste trabalho, nas análises voltamétricas efetuaram-se dois ciclos de varrimento, usando-se apenas os dados referentes ao último voltamograma, uma vez que independentemente do número de ciclos que fossem efetuados, comparando ciclos da mesma análise, os resultados obtidos eram praticamente coincidentes, o que significa que o sinal da solução estabilizava rapidamente. Verificou-se também que com o aumento do número de ciclos, a solução ficava turva devido possivelmente aos precipitados resultantes de reações ocorridas entre os íons cloro com o eletrodo de prata, o que podia influenciar os resultados da quantificação do TCA.

Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente.

Foi utilizado como solvente uma mistura de ACN e água desionizada. O solvente orgânico foi adicionado devido à baixa solubilidade do TCA e do TBAP (eletrólito de suporte) em água. Poder-se-ia ter utilizado apenas o solvente orgânico, ACN, no entanto, usou-se a água como co-solvente uma vez que a amostra é aquosa (água de cozedura das pranchas de cortiça). Para além disso, como já referido, está reportado na literatura que a água amplifica os efeitos catalíticos da prata (Rondinini *et al.*, 2000).

3.4.2.1. Sistema voltamétrico

O sistema voltamétrico (Figura 3.1) utilizado consistia num sistema de três elétrodos, o elétrodo de trabalho de prata (M295Ag da *Radiometer*) (ET), elétrodo de referência de junção dupla Ag/AgCl (M90-02, Orion) (ER) e um elétrodo auxiliar ou contra-elétrodo de platina (M241Pt, da *Radiometer*) (CE). Estes elétrodos são ligados a um dispositivo de medição, *Potentiostat-Galvanostat* (PG580, da *Uniscan*), que por sua vez está ligado a um computador com o *Software* UiEChem v.1.34 (*Unisan Instruments Ltd*) apropriado para a aquisição de dados. O ET representado na Figura 3.1 (a), tem uma forma cilíndrica com aproximadamente 98 mm^2 (5 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento).

Os elétrodos utilizados em todas as experiências foram lavados cuidadosamente com água desionizada, não sendo necessário por isso proceder-se a qualquer pré-estabilização ou outro tipo de tratamento. No entanto, no elétrodo de prata teve de ser usado também papel absorvente como auxiliar de limpeza antes de cada análise, devido à acumulação de uma camada negra na sua superfície, que poderia influenciar os resultados.

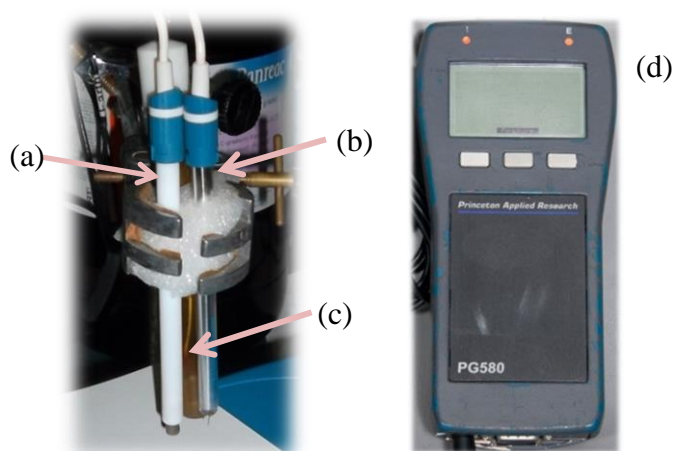


Figura 3.1 Elétrodos de trabalho (a), auxiliar (b) e de referência (c) e dispositivo de medição (d) utilizados nas experiências.

Os voltamogramas foram obtidos entre -2,0 e 1,6 V, a uma velocidade de varrimento de 100 mV/s. Em cada ensaio foram realizados dois ciclos, que demoraram cerca de 2 minutos cada um.

3.4.2.2. *Experiências preliminares*

Para verificar a proporção de acetonitrilo/água mais adequada e possível influência do solvente no sinal voltamétrico, procedeu-se à preparação de uma solução padrão de TCA (10 mg/L) com várias misturas de ACN/água, com razões volumétricas de 1:1 até 2,5:1 (v:v) e contendo 0,1 M (concentração final) de TBAP (eletrólito de suporte). Estas soluções foram analisadas nas condições anteriormente referidas.

No estudo da influência da concentração de TCA no sinal voltamétrico, foram preparadas várias soluções padrão de TCA (0 a 3,4 mg/L) por diluição de uma solução-mãe de concentração de 0,124 g/L em ACN/água (1,5:1, v:v) com 0,1 M de TBAP. As diluições foram efetuadas com solução de ACN/água (1,5:1, v:v) com TBAP (0,1 M) para que apenas a concentração de TCA fosse afetada.

Foi ainda avaliada a influência do TBAP nos voltamogramas. Os ensaios desta experiência foram realizados entre -2 a 1,4 V a uma velocidade de varrimento de 100 mV/s. Foram preparados 100 mL de duas soluções padrão de TCA com concentração de 1,24 mg/L de TCA numa solução de ACN e água (1,5:1; v:v). A influência do TBAP foi avaliada por comparação dos voltamogramas das duas soluções de ACN/água (1,5:1; v:v), uma na ausência de TBAP e outra contendo uma concentração de 0,1M. A cada uma das soluções iniciais de ACN/água (1,5:1; v:v) (com ou sem TBAP) foram adicionados pequenos volumes da solução de TCA, preparada anteriormente, de modo a que na solução final estivesse o dobro de TCA analisado na voltametria cíclica anterior.

3.4.2.3. *Validação do método de quantificação do 2,4,6-tricloroanisol*

i. *Estudo da repetibilidade do sinal do solvente*

Este estudo foi realizado através da comparação dos voltamogramas obtidos da análise de soluções de ACN/água (1,5:1; v:v) com 0,1 M de TBAP, preparadas em três dias diferentes e analisadas duas vezes em cada dia. A variabilidade intra e inter dias foi avaliada qualitativamente analisando o grau de sobreposição dos voltamogramas obtidos.

ii. Identificação dos picos de oxidação e de redução do TCA

Para identificar os picos de oxidação e de redução do TCA, foram efetuados voltamogramas de soluções sem e com (1 e 4 ng/L) TCA em ACN/água (1,5:1; v:v), com TBAP (0,1M).

iii. Método de calibração, limites de detecção e quantificação

O método utilizado foi a calibração por adição de padrão com multipadrões, sendo a calibração feita diretamente na amostra à qual se fazem diversas adições de uma solução padrão. A curva de calibração é obtida pela representação gráfica de:

$$S_{a+p}V_f = m \times (C_aV_a + C_pV_p) \quad (3.1)$$

onde os parâmetros a variar são $S_{a+p}V_f$ e V_p , em que S_{a+p} representa o sinal obtido para a amostra mais o padrão, V_f é o volume final da diluição, m é o declive da curva de calibração, C_a representa a concentração do analito na amostra, V_a é o volume pipetado da amostra, C_p é a concentração do analito na solução padrão e V_p volume pipetado da solução padrão (Harris, 2007).

Existem duas possibilidades de representação gráfica desta expressão na forma de equação linear, como mostra a Figura 3.2.

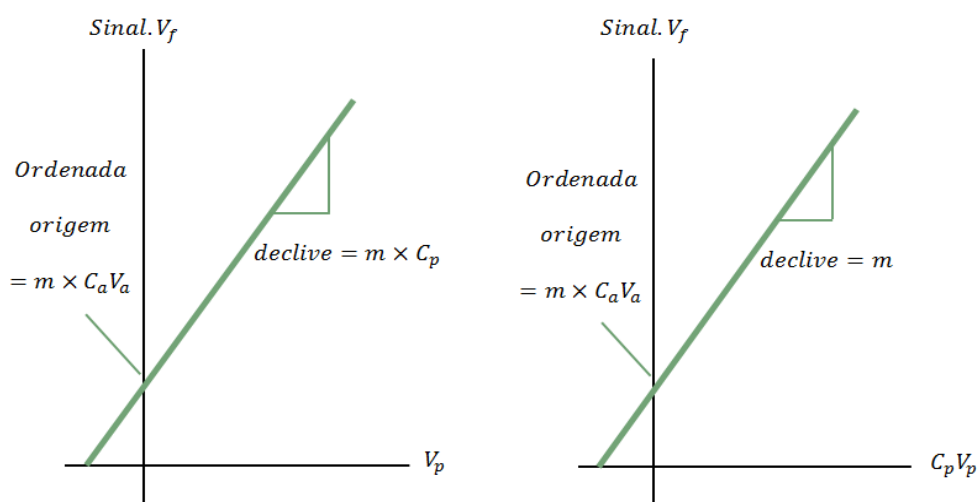


Figura 3.2 Representação gráfica da expressão da calibração por adição de padrão com multipadrões (adaptado de Harris, 2007).

Uma vez que os volumes da solução padrão são adicionados à mesma amostra, o volume final, após cada adição de solução padrão, varia, daí não poder ser considerado constante e a expressão da curva de calibração ter de vir não só em função de S_{a+p} mas também em função de V_f .

No presente trabalho, estabeleceu-se uma relação linear entre a amplitude total da intensidade da corrente, somando os picos de redução e de oxidação (como mostra a Figura 3.3), multiplicado pelo volume final da amostra após cada adição da solução padrão de TCA e o volume total da solução padrão de TCA adicionado. De modo a minimizar quaisquer potenciais interferências na matriz da amostra, foi estipulado que o volume adicionado de solução padrão deveria ser inferior a 3% do volume final.

Para o estudo da linearidade e determinação dos limites de detecção e quantificação foram usadas soluções padrão de TCA com uma concentração de aproximadamente 200 ng/L em ACN/água (1,5:1; v:v) TBAP (0,1M). Estas soluções foram diluídas de modo a que a solução final tivesse uma concentração de TCA entre 1 e 4 ng/L, depois de cada adição de padrão (4×150 µL) a um volume inicial predefinido de 25 mL de solução de ACN/água (1,5:1; v:v) com TBAP (0,1M).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com os perfis de oxidação/redução registados na região de -0,9 a 0 V, com base na relação linear obtida entre a amplitude de corrente corrigida através da subtração do sinal do solvente (0,1 M TBAP em solução ACN/água, 1,5:1; v:v) e as concentrações de TCA adicionadas.

Uma vez que eram esperados voltamogramas cíclicos irreversíveis, a soma dos picos de redução e de oxidação foi calculada por interpolação com o auxílio de uma linha de base tangente aos extremos dos picos, como se pode verificar na Figura 3.3, de modo a tornar possível a leitura computacional das áreas. Esta abordagem é similar à normalmente utilizada na análise cromatográfica.

Estes limites (LD e LQ) foram determinados de acordo com os parâmetros das curvas de calibração, tendo sido definidos como 3,3 e 10 vezes o valor do erro da ordenada na origem dividido pelo declive, respetivamente (Snyder e Kirkland, 1979; Ermer e Miller, 2005). Este método foi também aplicado para determinar a concentração de TCA nas soluções que serviram de amostra (solução de ACN/água (1,5:1 v:v) com 0,1 M de

TBAP), cujo valor deveria ser zero, de um ponto de vista teórico, uma vez que não estavam contaminadas com TCA.

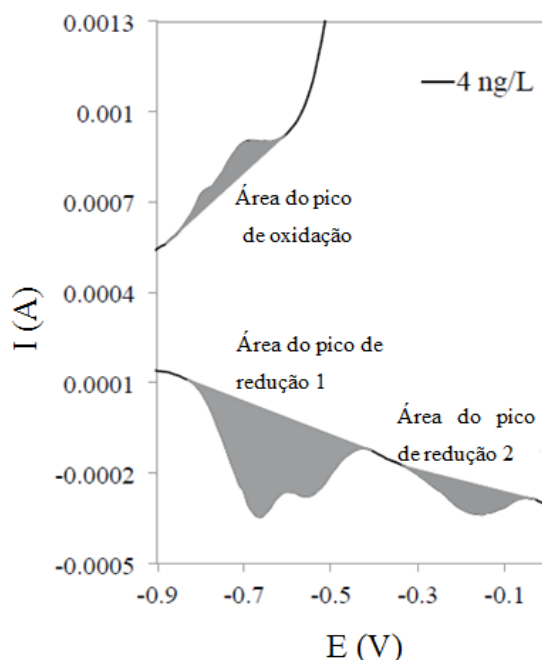


Figura 3.3 Áreas dos picos de redução e de oxidação dos voltamogramas cíclicos, usadas para calcular sinal global de TCA na solução de ACN/água com 0,1 M de TBAP.

3.4.2.4. Precisão e exatidão da análise por voltametria cíclica

De modo a poder avaliar a precisão do método analítico, foram analisadas amostras de água de cozedura das pranchas de cortiça fornecidas pela M. A. Silva. Estas amostras foram previamente diluídas com ACN contendo 0,17 M de TBAP, de modo a obter uma amostra com a proporção desejada de 1,5:1 (v:v) de ACN/água, com 0,1 M de TBAP. Esta diluição foi efetuada de modo a minimizar os possíveis efeitos do solvente, devido a diferenças na proporção relativa de ACN/água na solução final, assim como às diferenças de concentração de TBAP. Por outro lado, o uso de um método de calibração de adição de padrão requer uma nova calibração em cada amostra, o que permite minimizar as possíveis interferências da matriz da amostra.

A concentração de TCA nas amostras de água de cozedura, antes e depois da adição da solução padrão, foi determinada através de um procedimento semelhante ao descrito no ponto anterior.

Para avaliar a repetibilidade do método (estudo da precisão das análises efetuadas no mesmo dia) foram comparados os voltamogramas cíclicos obtidos na análise de três amostras reais com diferentes concentrações de TCA, baixa, média e elevada (selecionadas de acordo com os resultados obtidos na análise realizada por GC-MS) com uma proporção de ACN/amostra de 1,5:1, v:v e com TBAP (0,1 M). As amostras foram analisadas em triplicado no mesmo dia, utilizando as condições experimentais previamente estabelecidas. A variabilidade da análise das amostras no mesmo dia foi determinada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR%).

O estudo da exatidão do método proposto para quantificar o TCA por voltametria cíclica foi realizado também com amostras reais de água de cozedura das pranchas de cortiça. Este estudo foi efetuado pela comparação da concentração de TCA, das amostras reais, obtidas por voltametria cíclica e as concentrações obtidas por GC-MS (método de referência usado na empresa), através de testes estatísticos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos da análise de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) em amostras de água de cozedura de pranchas de cortiça por voltametria cíclica. As experiências efetuadas incidiram no estudo de:

- (i) Proporção volumétrica relativa de solvente orgânico, acetonitrilo (ACN), na solução aquosa final com 0,1 M de perclorato de tetrabutylamónio (TBAP) e sua influência no voltamograma cíclico obtido para uma concentração pré-definida de TCA (10 mg/L);
- (ii) Resposta do sistema ACN/água (1,5:1, v:v) com 0,1 M de TBAP ao incremento da concentração de TCA em solução (entre 0 e 3,4 mg/L);
- (iii) Influência de um eletrólito forte de suporte (TBAP) na solução de ACN/água (1,5:1, v:v) através do método de adição de padrão por adição de volumes de solução de TCA (1,24 mg/L de TCA em ACN/água (1,5:1, v:v));
- (iv) Avaliação da precisão do sinal do ensaio em branco para as condições finais estabelecidas para a solução de análise, no mesmo dia e entre dias;
- (v) Estabelecimento de curvas de calibração para a quantificação de TCA em soluções padrão (ACN/água) pelo método da adição de padrão e obtenção dos respetivos limites de deteção e quantificação;
- (vi) Repetibilidade, precisão intermédia e exatidão da análise por voltametria cíclica para as amostras de água de cozedura das pranchas de cortiça.

4.1. EXPERIÊNCIAS PRELIMINARES

As experiências preliminares realizadas tiveram como objetivo averiguar a influência da quantidade de acetonitrilo e TBAP presente na mistura com água, bem como, da adição de TCA nos voltamogramas cíclicos obtidos, de forma a otimizar as condições para a análise do TCA.

Nestas experiências preliminares de avaliação utilizaram-se diversas proporções de acetonitrilo e água (ACN/água) com TBAP (0,1 M) e 10 mg/L de TCA, tendo-se obtido os resultados de voltametria cíclica (VC) que se encontram na Figura 4.1.

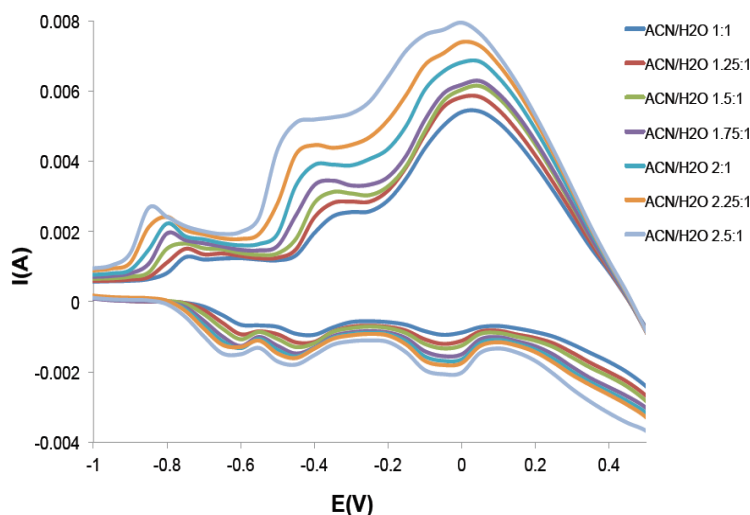


Figura 4.1 Voltamogramas obtidos nos ensaios realizados na otimização das proporções volumétricas de ACN/água, com TCA (10 mg/L) e TBAP (0,1 M).

Como se pode observar na Figura 4.1, a quantidade relativa de acetonitrilo na mistura de solventes afeta a intensidade do sinal, existindo uma tendência para o incremento do sinal com o aumento da quantidade de ACN.

Após análise dos voltamogramas selecionou-se a proporção (1,5:1; v:v) de ACN/água, uma vez que permitia obter voltamogramas com elevada sensibilidade mantendo o propósito do trabalho, que era conseguir desenvolver um método de quantificação de TCA mais barato que os convencionais e que pudesse ser visto como uma alternativa “verde”, e por isso a proporção de solvente orgânico a usar deveria ser a menor possível.

Para avaliar se a proporção selecionada de ACN/água 1,5:1 (v:v) com 0,1 M de TBAP, que representa uma proporção com quantidades moderadas de ACN, permitia obter uma sensibilidade aceitável para diferentes níveis de TCA, estudou-se o efeito do aumento da concentração de TCA nos voltamogramas obtidos para soluções de ACN/água 1,5:1 (v:v) com 0,1 M de TBAP. Para tal, utilizaram-se níveis de concentração de TCA a variar entre 0 e 3,4 mg/L, cujos voltamogramas se apresentam na Figura 4.2.

Da análise dos resultados da Figura 4.2 pode verificar-se que existe um aumento do sinal à medida que a concentração de TCA presente na solução também aumenta, tanto na região catódica (referente à redução, curvas inferiores do gráfico) como na anódica (referente à oxidação, curvas superiores do gráfico), em especial na região de potencial compreendido entre -0,6 e 0 V, o que sustenta a pretensão de que esta metodologia poderá ser usada para quantificar TCA, nomeadamente na análise de amostra de água de cozedura das pranchas de cortiça provenientes da indústria corticeira.

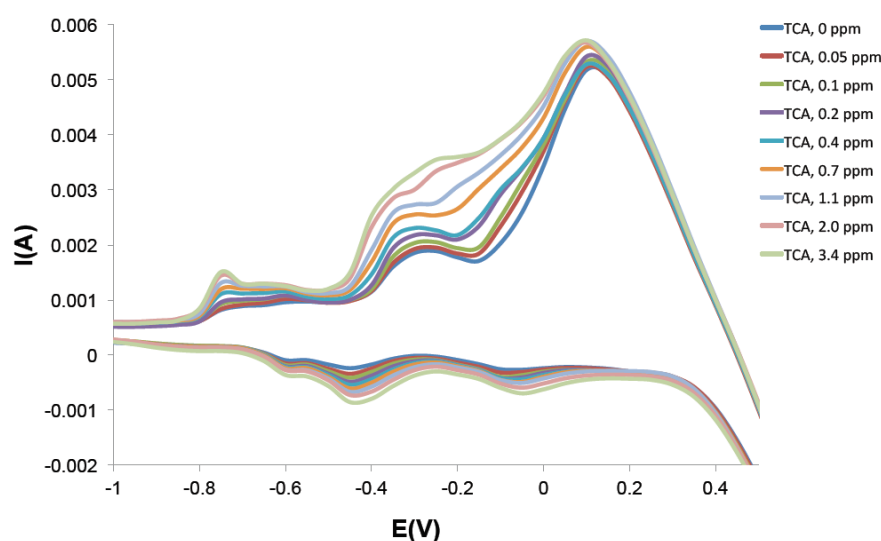


Figura 4.2 Voltamogramas obtidos para amostras com diferente concentração de TCA, com 0,1 M de TBAP e proporção ACN/água (1,5:1; v:v).

Estudou-se também a necessidade de utilização do eletrólito de suporte TBAP, de forma a averiguar qual a sua influência nos voltamogramas e inferir a necessidade da sua utilização.

A solução de ACN/água (1,5:1; v:v) com e sem 0,1 M de TBAP foi usada como base das experiências, uma vez que, foi utilizado o método de adição de padrão, e a esta solução foram adicionados pequenos volumes de solução de TCA (1,24 mg/L de TCA em ACN/água, 1,5:1 v:v, com e sem 0,1 M TBAP, respetivamente) para assim poder observar o efeito nos picos dos voltamogramas.

Os resultados obtidos nos ensaios de adição de padrão TCA realizados com ACN/água (1,5:1, v:v) sem TBAP estão apresentados na Figura 4.3. Estes ensaios serviram para perceber e demonstrar a necessidade de utilização de eletrólitos de suporte, que é o caso do TBAP, na voltametria cíclica. A solução inicial no copo de análise

continha um volume de 25 mL, ficando no final do ensaio com 29,5 mL. É de referir também que estes ensaios foram realizados sem que entre cada análise voltamétrica fosse efetuada a limpeza do eletrodo de trabalho.

Como se pode verificar pelo gráfico da Figura 4.3, os resultados obtidos sem a presença de TBAP demonstram os voltamogramas a desenvolverem-se no sentido positivo do potencial à medida que é adicionado o TCA pelo método de adição de padrão. Este resultado revela a instabilidade da solução sem o eletrólito de suporte.

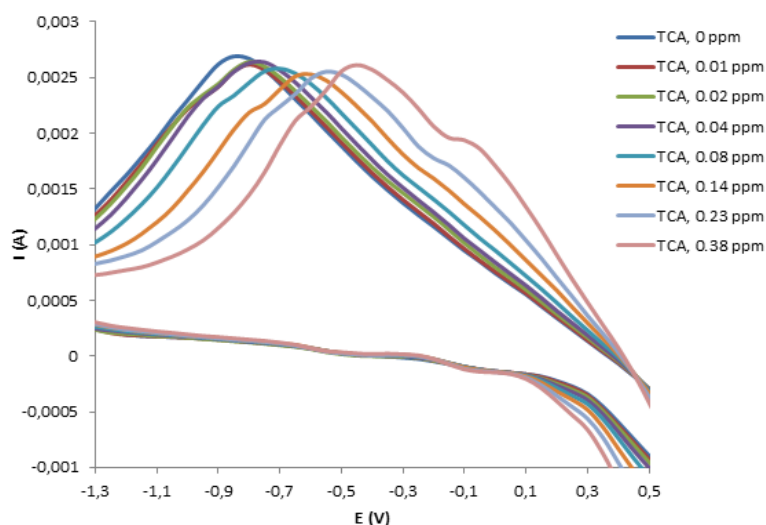


Figura 4.3 Voltamogramas obtidos no estudo do efeito do TBAP na análise de TCA em mistura de ACN/água (1,5:1; v:v).

Na Figura 4.4 mostram-se os voltamogramas obtidos da adição de solução padrão de TCA a ACN/água (1,5:1; v:v) com 0,1 M de TBAP. A figura mostra resultados mais uniformes, ou seja, verifica-se um aumento do sinal com o aumento da concentração de TCA presente na solução analítica, sem que haja deslocação desse sinal. Demonstra-se desta forma, a importância da presença do TBAP nas experiências de voltametria cíclica, como eletrólito de suporte. Por outro lado, é também referido na literatura que os sais de amónio intensificam o sinal da intensidade de corrente quando usados com eletrodos de prata (Rondinini *et al.*, 2000).

Nestes ensaios notou-se que à medida que o TCA era adicionado o sinal se tornava mais intenso de acordo com a diferença entre cada adição de volume de solução contendo TCA e o branco.

À medida que o ensaio progredia verificou-se uma ligeira precipitação de um pó negro durante o pico de oxidação, no elétrodo de prata (elétrodo de trabalho, ET). Esta eletrodeposição é o resultado de uma reação entre a prata, o ACN e o TBAP durante a troca de elétrons, uma vez que o acetonitrilo em contacto com sais quaternários, como o TBAP, apresenta propriedades eletroquímicas que o tornam num possível eletrólito que contribui para a eletrodeposição (Mele e Bozzini, 2009).

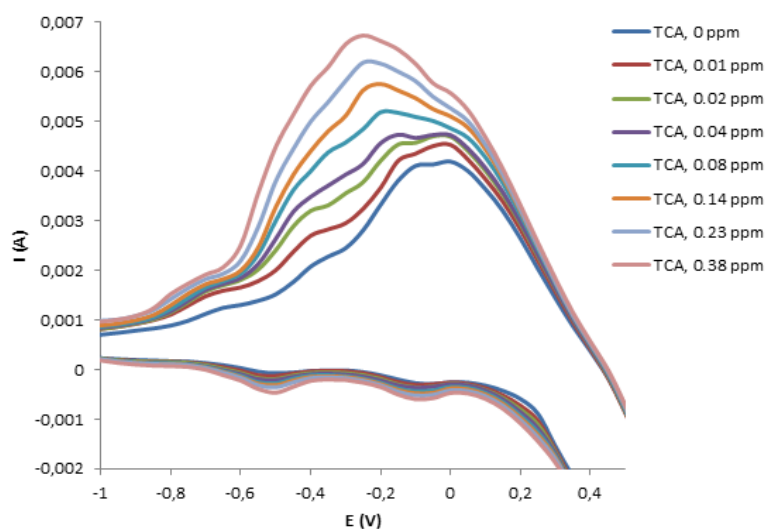


Figura 4.4: Voltamogramas de soluções com diferentes concentrações de TCA, com ACN/água (1,5:1; v:v) e TBAP (0,1 M).

4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO 2,4,6-TRICLOROANISOL

4.2.1. Estudo da repetibilidade do sinal do solvente

Este estudo foi realizado através da comparação dos voltamogramas obtidos da análise de soluções de ACN/água (1,5:1; v:v) com 0,1 M de TBAP, preparadas em três dias diferentes e analisadas duas vezes em cada dia. A variabilidade intra e inter dias foi avaliada qualitativamente analisando o grau de sobreposição dos voltamogramas obtidos. Os seis voltamogramas correspondentes a três soluções diferentes analisadas duas vezes em cada dia podem ser analisados na Figura 4.5. seguidamente apresentada.

Como se pode verificar, os voltamogramas apresentam um certo grau de sobreposição com uma variação pouco significativa, o que revela uma repetibilidade satisfatória indicando que a metodologia experimental utilizada é adequada.

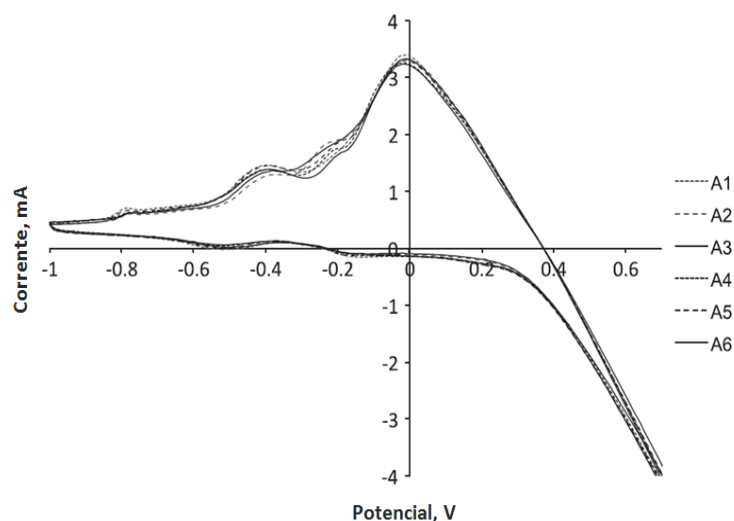


Figura 4.5 Voltamogramas cíclicos do ensaio de repetibilidade das soluções de ACN/água (1,5:1, v:v) com 0,1 M de TBAP.

Por outro lado, a ausência de variações significativas permite depreender que a possível libertação de íons de cloreto do eletrodo de referência (junção dupla do ER Ag/AgCl) não é significativa ou caso ocorra é constante de ensaio para ensaio realizado. Também esta concordância pode ser devida às condições de operação constantes, tal como a composição da solução de análise, nomeadamente a percentagem relativa de cada solvente e a concentração do eletrólito de suporte.

4.2.2. Identificação dos picos de oxidação e de redução do TCA

A identificação dos picos de oxidação e de redução devidos à presença do TCA foi feita a partir da comparação dos voltamogramas de soluções contendo ou não TCA.

A área total dos picos de redução e/ou oxidação foi determinada a partir de uma tangente interpolada servindo como linha de base de modo a facilitar o tratamento

computacional e obter a informação relevante para cada perfil das soluções de ACN/água (1,5:1 v:v) com concentrações de TCA de 0, 1 e 4 ng/L.

Nestes ensaios também se observou um pó negro a precipitar na superfície do eletrodo de prata, que se admite ser devido à formação de óxido de prata. Apesar disso, este fenômeno não afetou a quantificação do TCA, tendo-se constatado um aumento do sinal voltamétrico após cada adição de solução padrão, sem no entanto, ocorrer uma evidente saturação do sinal, o que leva a crer que o desempenho do eletrodo de prata não foi afetado negativamente por este fenômeno.

Como se pode observar na Figura 4.6, os voltamogramas das soluções analisadas com e sem TCA são diferentes possibilitando assim a identificação dos seus picos de oxidação e de redução.

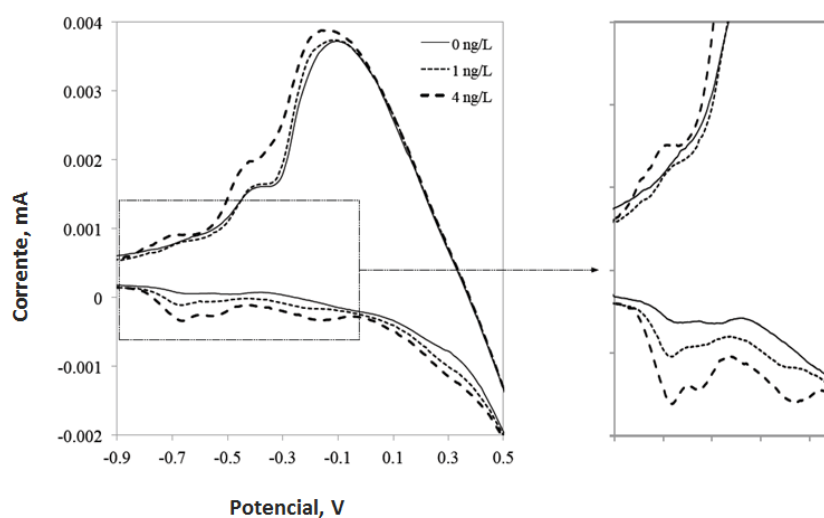


Figura 4.6 Voltamogramas de misturas ACN/água (1,5:1; v:v), com 0,1 M de TBAP, sem (0 ng/L) e com TCA (1 e 4 ng/L).

A Figura 4.6 mostra a comparação entre os voltamogramas obtidos por voltametria cíclica entre -2 e 1,4 V para misturas de ACN/água (1,5:1; v:v) com 0,1 M de TBAP com ou sem adição de TCA. Estes voltamogramas mostram que na região negativa (-0,9 a 0 V) existem diferenças significativas entre cada um, o que indica que o TCA pode ser detetado nesta região, ou seja, na zona da redução. Com a adição de TCA observa-se que aparecem picos de redução e de oxidação, e que estes aumentam com o aumento da concentração deste composto.

4.2.3. Método de Calibração, limites de detecção e quantificação

Nos estudos de calibração por adição de padrão começou-se por usar soluções sem TCA com 0,1 M de TBAP em ACN/água (1,5:1; v:v), às quais se adicionaram diferentes volumes de solução padrão de TCA preparada em ACN/água (1,5:1; v:v), com 0,1 M de TBAP, de forma a obter-se concentrações de TCA compreendidas entre 0 e 70,2 ng/L. A Figura 4.7 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para estes ensaios e que permitiram realizar a calibração pelo método de adição de padrão. Este método de calibração foi o escolhido porque permite minimizar possíveis variações da matriz das amostras a ser analisadas.

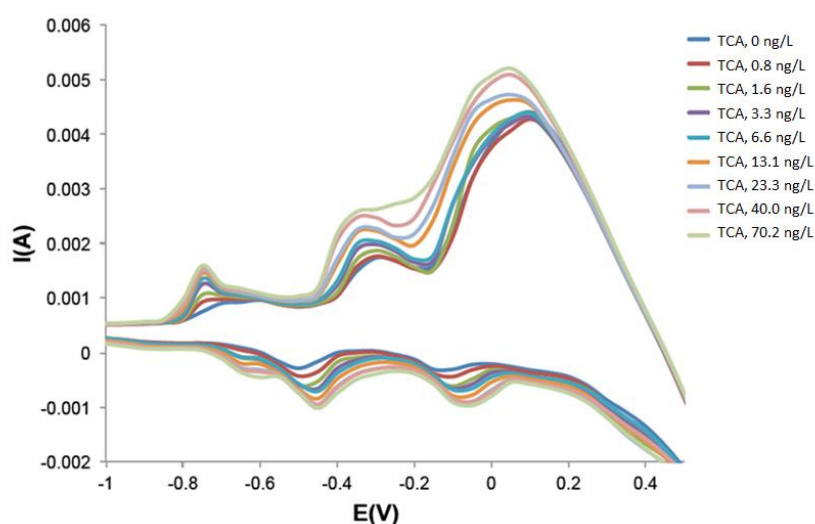


Figura 4.7 Voltamogramas de soluções com diferentes concentrações de TCA em ACN/água (1,5:1; v:v) com TBAP (0,1 M).

Na Figura 4.8 mostra-se um exemplo de uma das calibrações obtidas por adição de padrão usando o sinal corrigido com o volume de padrão adicionado em função da concentração de TCA, tendo-se usado níveis entre 1,22 e 4,75 ng/L.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos são de $0,31 \pm 0,01$ ng/L e $0,95 \pm 0,05$ ng/L, respetivamente, sendo valores aceitáveis, considerando que os limites de detecção são só ligeiramente superiores aos observados na determinação analítica por GC-MS pelos autores Márquez-Sillero *et al.* (2011) e Schmarr *et al.* (2012) ou da mesma

ordem de grandeza aos obtidos por Patil *et al.* (2011). Usando os dados da calibração obtida e através do processamento matemático da aplicação do método da adição de padrão foi determinada a concentração de uma solução contendo somente ACN/água com 0,1 M de TBAP, que se esperaria ser 0 ng/L. O valor médio de concentração de TCA obtido nestas experiências foi de $1,0 \pm 0,2$ ng/L, podendo considerar-se que a concentração estimada para a solução é semelhante ao limite de quantificação obtido pela voltametria cíclica, possivelmente devido a erros experimentais.

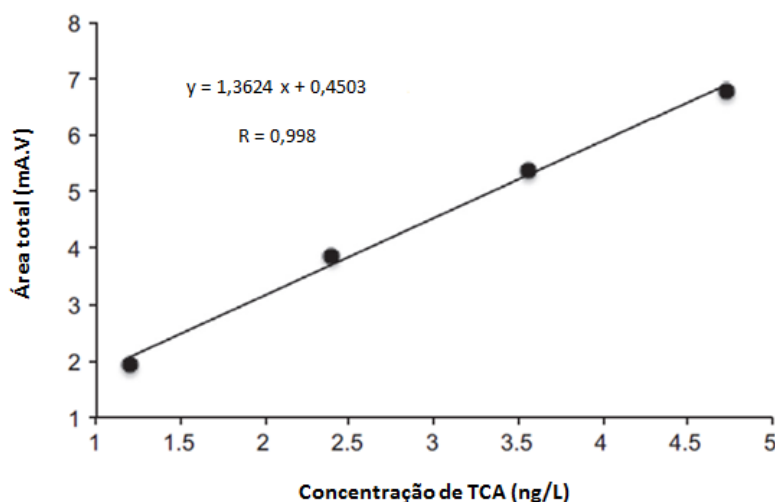


Figura 4.8 Curva de calibração obtida pelo método de adição de multipadrões usada para calcular os limites teóricos de detecção e de quantificação de TCA através da voltametria cíclica.

4.3. PRECISÃO E EXATIDÃO DA ANÁLISE POR VOLTAMETRIA CÍCLICA

A concentração de TCA presente na água de cozedura das pranchas de cortiça proveniente de uma indústria corticeira foi, como referido, determinada através de GC-MS. Analisaram-se vinte e duas amostras nas quais a concentração de TCA se encontrava numa gama compreendida entre 7,5 a 61,5 ng/L e houve apenas uma em que não foi detetada a presença deste composto.

A Figura 4.9 mostra um esquema de três voltamogramas cíclicos obtidos para três amostras de água de cozedura das pranchas de cortiça (ACN/amostra, 1,5:1 v:v com 0,1 M de TBAP), numa região de potencial de -0,9 a 0 V com três concentrações de TCA: 0, 36 e 52 ng/L. De forma consonante com as experiências realizadas com ACN/água

também nas amostras reais de água de cozedura de cortiça se verifica diferenças significativas nos três voltamogramas obtidos a diferentes concentrações.

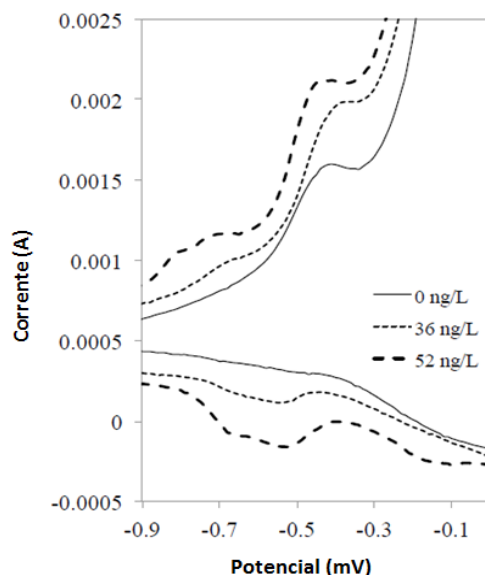


Figura 4.9 Voltamogramas cíclicos de três soluções de amostras de água de cozedura (ACN/amostra (1,5:1; v:v) TBAP (0,1 M)) com diferentes concentrações de TCA de acordo com os dados obtidos por GC-MS.

A constatação das diferenças existentes entre os três voltamogramas permite deduzir que qualquer indivíduo (mesmo sem formação técnica específica) que utilize este método de quantificação consegue depreender, de um ponto de vista meramente qualitativo, se existe ou não contaminação de TCA nas amostras analisadas, tendo como comparação o voltamograma com 0 ng/L de TCA. Pode, também, perceber-se que um aumento da concentração de TCA origina um aumento nos picos de redução e de oxidação na gama de potencial referida. Deste modo, pode-se afirmar que este método poderá ser uma ferramenta no processo de monitorização dos níveis de TCA presentes na água de cozedura da cortiça.

Avaliou-se o método de voltametria cíclica quanto à sua precisão, através dos testes de repetibilidade realizados no mesmo dia, analisando três amostras com concentrações de TCA de 7,5, 17,5 e 31,0 ng/L (dados obtidos por GC-MS). As percentagens do desvio padrão relativo (DPR%) obtidas foram respetivamente de 0,3%, 2,0% e 3,0%. Uma vez que estes resultados são inferiores a 5%, pode-se afirmar que a precisão apresentada por este método é satisfatória, estando de acordo com os DPR% reportados na bibliografia

(Riu *et al.*, 2006; Vlachos *et al.*, 2007; Vestner *et al.*, 2010; Olivella *et al.*, 2012; Schmarr *et al.*, 2012).

A exatidão do método foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos para as concentrações de TCA, das amostras de água de cozedura das pranchas de cortiça, através deste método com os resultados obtidos pelo método de GC-MS (método usado como referência). As concentrações de TCA, na VC foram obtidas pelo método de calibração por adição de multipadrões. A Figura 4.10 mostra o exemplo de uma curva de calibração obtida para a análise de uma das amostras de água de cozedura.

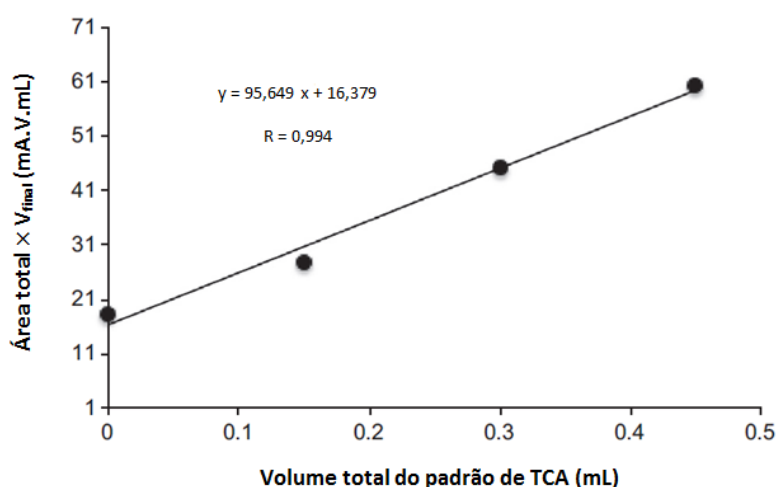


Figura 4.10 Curva de calibração obtida para o cálculo da concentração de TCA em amostras de água de cozedura de pranchas de cortiça através de voltametria cíclica.

Os valores do declive e da ordenada na origem e os respetivos intervalos de confiança com um nível de confiança a 95% (obtidos pelo teste *t*-Student) referentes à reta obtida pelo modelo de regressão linear para os dados experimentais (representada a cheio na Figura 4.11) encontram-se na Tabela 4.1.

Estes resultados revelam uma exatidão satisfatória visto que o declive teórico (valor igual a 1, representado pela linha a tracejado na Figura 4.11) é quase coincidente com os obtidos experimentalmente.

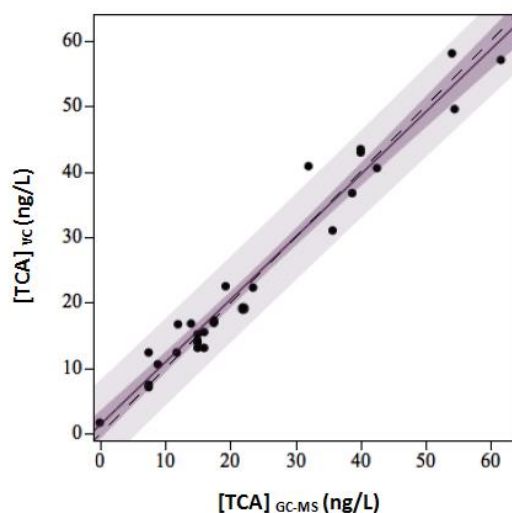


Figura 4.11 Concentrações de TCA nas amostras reais de água de cozedura das pranchas de cortiça, estimadas por voltametria cíclica comparativamente às obtidas por GC-MS, método considerado como referência.

Tabela 4.1 Parâmetros do modelo de regressão linear e respetivos intervalos de confiança com níveis de significância de 5%.

MRL	Valores	Intervalo de Confiança
Declive	$0,96 \pm 0,04$	[0,88; 1,03]
Ordenada na origem (ng/L)	$1,3 \pm 1,0$	[-0,84; 3,46]

Deste modo, pode considerar-se que, do ponto de vista estatístico, como os valores do declive e da ordenada na origem obtidos pelo modelo de regressão linear apresentam intervalos de confiança que contêm o 1 e o 0, respetivamente, são iguais aos teoricamente previstos (Roig e Thomas, 2003a; Roig e Thomas, 2003b).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

O objetivo principal do trabalho experimental realizado consistiu em testar e validar um novo método analítico que permitisse quantificar o 2,4,6-tricloroanisol (TCA) presente na água resultante do processo de cozedura das pranchas de cortiça, proveniente de uma indústria corticeira portuguesa, que fosse viável, mais versátil e mais económico do que os que são utilizados atualmente, nomeadamente a cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS). Esse método consistiu na análise eletroquímica por voltametria cíclica (VC).

Através das experiências preliminares selecionou-se uma proporção da mistura de acetonitrilo (ACN)/água (ou ACN/amostra) (1,5:1 v:v), que permitiu obter bons resultados e manter o propósito do trabalho, de desenvolver um método de quantificação de TCA mais económico que os utilizados pela indústria corticeira. Verificou-se também que a utilização do eletrólito de suporte, perclorato de tetrabutylamónio (TBAP), permitia obter um esperado aumento do sinal com o aumento da concentração de TCA demonstrando a sua importância na técnica utilizada, e que o método de calibração mais adequado para a quantificação do TCA era o da adição de padrão.

Depois de realizado este trabalho experimental, verifica-se que os resultados são satisfatórios, tendo sido obtidos limites de deteção e de quantificação de $0,31 \pm 0,01$ ng/L e $0,95 \pm 0,05$ ng/L, respetivamente, considerando-se valores aceitáveis, ligeiramente superiores aos de GC-MS ou da mesma ordem de grandeza.

Relativamente à precisão da VC, obteve-se em desvio padrão relativo (DPR%) inferior a 5% em todas as análises efetuadas, pelo que se considera satisfatória.

Com base nisto, pode afirmar-se que este método analítico eletroquímico, baseado em voltametria cíclica, pode ser utilizado como uma ferramenta no controlo de qualidade no processo de fabrico das rolhas de cortiça, nomeadamente no processo de cozedura. Uma vez que, o equipamento usado na voltametria cíclica é portátil, rápido e de baixo custo e, que não necessita de técnicos especializados para realizar estas análises, revela-se uma mais-valia nos processos de controlo *in-situ*, na indústria corticeira.

Torna-se, deste modo, possível com a VC, efetuar um controlo de qualidade preliminar da cortiça *in situ* e tomar medidas de ação de acordo com os resultados obtidos, relegando a metodologia GC-MS para o controlo de qualidade do produto final.

Como proposta futura, poder-se-ia estender este estudo à etapa de lavação (uma das etapas finais do processo de produção) de modo a que também nesta etapa se possa fazer o controlo de qualidade das rolhas de cortiça já fabricadas de forma mais sistemática e se certificar a ausência de TCA ou caso contrário, se proceder a algum tratamento adicional por forma a eliminar este composto, reduzindo a hipótese de este vir a contaminar vinhos posteriormente.

Seria, ainda, imprescindível alargar o estudo aos precursores do TCA (nomeadamente o 2,4,6-triclorofenol (TCP)) de modo a poder quantificá-los de forma análoga e assim obter melhores resultados para a prevenção ou combate à contaminação da cortiça pelo TCA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim, G. (2012). <http://www.amorimcork.com/>
- APCOR. (2004). "*Kit técnico sobre rolhas de cortiça*".
- APCOR. (2010). "*Rolhas de cortiça - Cork Information Bureau*".
- APCOR. (2011a). "*Estudo da Caracterização Sectorial*".
- APCOR. (2011b). "*Manual Técnico das Rolhas*".
- APCOR. (2013a). "Cortiça" Anuário 2013. Descarregado em 10-12-2013 de http://www.apcor.pt/userfiles/File/Publicacoes/APCOR_ANUARIO_2013.pdf.
- APCOR. (2013b). <http://apcor.pt/artigo/236.htm>
- Campillo, N., Peñalver, R., e Hernández-Córdoba, M. (2008). "*Solid-phase microextraction for the determination of haloanisoles in wines and other alcoholic beverages using gas chromatography and atomic emission detection*." *Journal of Chromatography A*, 1210(2), 222-228.
- Campillo, N., Viñas, P., Cacho, J. I., Peñalver, R., e Hernández-Córdoba, M. (2010). "*Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography-mass spectrometry*." *Journal of Chromatography A*, 1217(47), 7323-7330.
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S., and Labadie, M.-D. (2004). "*Identification and Responsibility of 2,4,6-Tribromoanisole in Musty, Corked Odors in Wine*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1255-1262.
- Coque, J. J. R., Pérez, E. R., Goswami, M., Martínez, R. F., García, S. C., Rodríguez, M. L. A., e Martín, J. F. M. (2006). "*Contaminação do vinho por haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis*", INBIOTEC, pp. 1-66.
- Duarte, M. V., Lozano-Sanchez, P., e Katakis, I. (2009). "*Copper UPD as non-specific adsorption barrier in electrochemical displacement immunosensors*." *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7), 2205-2210.
- Ermer, J., e Miller, J. H. M. (2005). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Ewing, G. W. (1987). *Métodos instrumentais de análise química*: Edgard Blücher Ltda.
- Ezquerro, O., Garrido-López, A., e Tena, M. T. (2006). "*Determination of 2,4,6-trichloroanisole and guaiacol in cork stoppers by pressurised fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry*." *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 18-24.
- Fontana, A. R. (2012). "*Analytical methods for determination of cork-taint compounds in wine*." *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37(0), 135-147.
- Fontana, A. R., Patil, S. H., Banerjee, K., e Altamirano, J. C. (2010). "*Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction for Determination of 2,4,6-*

- Trichloroanisole in Wine Samples by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry.*" Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 4576–4581.
- Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., e Lorenzo, F. (2004). "*Analysis of anisoles in wines using pervaporation coupled to gas chromatography–mass spectrometry.*" Journal of Chromatography A, 1049(1–2), 147-153.
- Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., e González, A. G. (2005). "*Optimisation of a pressurised liquid extraction method for haloanisoles in cork stoppers.*" Analytica Chimica Acta, 540(1), 17-24.
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis*, New York: W. H. Freeman and Company.
- Hayasaka, Y., MacNamara, K., Baldock, G. A., Taylor, R. L., e Pollnitz, A. P. (2003). "*Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis.*" Analytical and Bioanalytical Chemistry, 375(7), 948-55.
- Insa, S., Anticó, E., e Ferreira, V. (2005). "*Highly selective solid-phase extraction and large volume injection for the robust gas chromatography–mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines.*" Journal of Chromatography A, 1089(1–2), 235-242.
- ISO. (2007). "*Cork Stoppers - Determination of releasable 2,4,6-trichloroanisole (TCA)*" ISO 20752:2007, International Standard Organization: Genebra, Suíça.
- Juanola, R., Guerrero, L., Subirà, D., Salvadó, V., Insa, S., Garcia Regueiro, J. A., e Anticó, E. (2004). "*Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork stoppers.*" Analytica Chimica Acta, 513(1), 291-297.
- Karpas, Z., Guamán, A. V., Calvo, D., Pardo, A., e Marco, S. (2012). "*The potential of ion mobility spectrometry (IMS) for detection of 2,4,6-trichloroanisole (2,4,6-TCA) in wine.*" Talanta, 93(0), 200-205.
- Liège, C. E. (2011). "*Código internacional das práticas rolheiras*"; Versão 6.03; Federação Europeia da Cortiça.
- Maggi, L., Mazzoleni, V., Fumi, M. D., e Salinas, M. R. (2008). "*Transformation ability of fungi isolated from cork and grape to produce 2,4,6-trichloroanisole from 2,4,6-trichlorophenol.*" Food Additives and Contaminants, 25(3), 265–269.
- Márquez-Sillero, I., Cárdenas, S., e Valcárcel, M. (2011). "*Direct determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by single-drop ionic liquid microextraction coupled with multicapillary column separation and ion mobility spectrometry detection.*" Journal of Chromatography A, 1218(42), 7574-7580.
- Martendal, E., Budziak, D., e Carasek, E. (2007). "*Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole from wine samples.*" Journal of Chromatography A, 1148(2), 131-136.
- Martínez-Uruñuela, A., González-Sáiz, J. M., e Pizarro, C. (2004). "*Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine.*" Journal of Chromatography A, 1056(1–2), 49-56.

- Martínez-Uruñuela, A., Rodríguez, I., Cela, R., González-Sáiz, J. M., e Pizarro, C. (2005). "Development of a solid-phase extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in red wine using gas chromatography–tandem mass spectrometry." *Analytica Chimica Acta*, 549(1–2), 117-123.
- Mazzoleni, V., e Maggi, L. (2007). "Effect of wine style on the perception of 2,4,6-trichloroanisole, a compound related to cork taint in wine." *Food Research International*, 40(6), 694-699.
- Mele, C., e Bozzini, B. (2009). "Silver electrodeposition from water–acetonitrile mixed solvents in the presence of tetrabutylammonium perchlorate." *Journal of Solid State Electrochemistry*, 13(10), 1553-1559.
- Mendham, J., Denney, R. C., Barnes, J. D., e Thomas, M. J. K. (2002). *Análise Química Quantitativa*, J. C. Afonso, P. F. Aguiar, and R. B. de Alencastro, tradutor: Vogel.
- Miki, A., Isogai, A., Utsunomiya, H., e Iwata, H. (2005). "Identification of 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) causing a musty/muddy off-flavor in sake and its production in rice koji and moromi mash." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(2), 178-183.
- Moore, E., Pravda, M., e Guilbault, G. G. (2003). "Development of a biosensor for the quantitative detection of 2,4,6-trichloroanisole using screen printed electrodes." *Analytica Chimica Acta*, 484(1), 15-24.
- OIV. (2012). "Determination of releasable 2,4,6-trichloroanisole in wine by cork stoppers (Resolution OIV-Oeno 296/2009)" Reference OIV-MA-AS315-16, in *Compendium of International Analysis of Methods*; International Organization of Vine and Wine: Paris, França, pp. 1-8.
- Olivella, M. A., Caixach, J., Planas, C., Oliveras, A., e Jové, P. (2012). "Concentrations of organochlorine pesticides and 2,4,6-trichloroanisole in cork bark." *Chemosphere*, 86(7), 754-758.
- Patil, S. H., Banerjee, K., Utture, S. C., Fontana, A. R., Altamirano, J. C., Oulkar, D. P., Wagh, S. S., Dasgupta, S., Patil, S. B., Jadhav, M. R., Ugare, B. R., Adsule, P. G., e Deshmukh, M. B. (2011). "Development and validation of a simple analytical method for the determination of 2,4,6-trichloroanisole in wine by GC–MS." *Food Chemistry*, 124(4), 1734-1740.
- Pereira, C. S., Danesh, P., Marques, J. J. F., e San Romão, M. V. (1999). "O Gosto a Rolha em Vinhos - Estado Actual dos Conhecimentos." *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 14 (2), 79-99.
- Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., e González-Sáiz, J. M. (2007a). "Optimisation of a headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatisation method for the direct determination of haloanisoles and halophenols in wine." *Journal of Chromatography A*, 1143(1–2), 26-35.
- Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., e González-Sáiz, J. M. (2007b). "Optimisation of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of haloanisoles and halophenols in cork stoppers." *Journal of Chromatography A*, 1149(2), 138-144.

- Pizarro, C., Sáenz-González, C., Perez-del-Notario, N., e González-Sáiz, J. M. (2010). "Optimisation of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the simultaneous determination of halophenols and haloanisoles in wines." *Journal of Chromatography A*, 1217(49), 7630-7637.
- Pizarro, C., Sáenz-González, C., Pérez-del-Notario, N., e González-Sáiz, J. M. (2012). "Microwave assisted extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction as a sensitive sample preparation method for the determination of haloanisoles and halophenols in cork stoppers and oak barrel sawdust." *Food Chemistry*, 132(4), 2202-2210.
- Prat, C., Besalú, E., Bañeras, L., e Anticó, E. (2011). "Multivariate analysis of volatile compounds detected by headspace solid-phase microextraction/gas chromatography: A tool for sensory classification of cork stoppers." *Food Chemistry*, 126(4), 1978-1984.
- Regueiro, J., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Monteagudo, J. C., e Cela, R. (2008). "Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters." *Journal of Chromatography A*, 1190(1–2), 27-38.
- Riu, M., Mestres, M., Busto, O., e Guasch, J. (2002). "Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection." *Journal of Chromatography A*, 977(1), 1-8.
- Riu, M., Mestres, M., Busto, O., e Guasch, J. (2006). "Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection." *Journal of Chromatography A*, 1107(1–2), 240-247.
- Roig, B., e Thomas, O. (2003a). "Rapid estimation of global sugars by UV photodegradation and UV spectrophotometry." *Analytica Chimica Acta*, 477(2), 325-329.
- Roig, B., e Thomas, O. (2003b). "UV monitoring of sugars during wine making." *Carbohydrate Research*, 338(1), 79-83.
- Rondinini, S. B., Mussini, P. R., Crippa, F., e Sello, G. (2000). "Electrocatalytic potentialities of silver as a cathode for organic halide reductions." *Electrochemistry Communications*, 2(7), 491-496.
- Schmarr, H. G., Koschinski, S., Sang, W., e Slabizki, P. (2012). "Trace level analysis of corks off-flavor compounds: Development of a new analytical method based on solid phase extraction and analysis by multidimensional gas chromatography with mass spectrometric detection." *Journal of Chromatography A*, 1226(0), 96-102.
- Sefton, M. A., e Simpson, R. F. (2005). "Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review." *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 226–240.
- Settle, F. A. (1997). *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, United States of America: Prentice Hall PTR.
- Silva, M. A. (2012). "M.A.Silva Cortiças, Lda.: Os nossos produtos".

- Simpson, R. F., Capone, D. L., and Sefton, M. A. (2004). "Isolation and Identification of 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a Potent Musty Compound from Wine Corks." *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (17), 5425–5430.
- Skoog, D. A., e Leary, J. J. (1992). *Principles of instrumental analysis*, Orlando: Sauders College Publishing.
- Skoog, D. A., West, D. M., e Holler, F. J. (1996). *Fundamentals of Analytical Chemistry*, United States of America: Thomson Learning, Inc.
- Snyder, L. R., e Kirkland, J. J. (1979). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- Soleas, G. J., Yan, J., Seaver, T., e Goldberg, D. M. (2002). "Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1032-9.
- Varelas, V., Sanvicens, N., Marco, M. P., e Kintzios, S. (2011). "Development of a cellular biosensor for the detection of 2,4,6-trichloroanisole (TCA)." *Talanta*, 84(3), 936-940.
- Vestner, J., Fritsch, S., e Rauhut, D. (2010). "Development of a microwave assisted extraction method for the analysis of 2,4,6-trichloroanisole in cork stoppers by SIDA–SBSE–GC–MS." *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 76-80.
- Vlachos, P., Kampioti, A., Kornaros, M., e Lyberatos, G. (2007). "Matrix effect during the application of a rapid method using HS-SPME followed by GC–ECD for the analysis of 2,4,6-TCA in wine and cork soaks." *Food Chemistry*, 105(2), 681-690.
- Wang, J. (2001). *Analytical Electrochemistry*: Wiley-VCH.
- Wang, Q., Geiger, A., Frias, R., and Golden, T. D. (2000). "An Introduction to Electrochemistry for Undergraduates: Detection of Vitamin C (Ascorbic Acid) by Inexpensive Electrode Sensors." *Chem. Educator*, 5, 58–60.